

Evaluierung und Etablierung eines aktiven,
immuntherapeutischen Ansatzes mit *S. pyogenes*
im experimentellen Pankreaskarzinommodell
der Maus



Dissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von
Claudia Maletzki
geboren am 21.02.1981 in Rostock
aus Rostock

Rostock, 11. April 2008

1. Gutachter: Prof. Dr. med. J. Emmrich
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin
Abteilung für Gastroenterologie
Medizinische Fakultät
Universität Rostock

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Bahl
Universität Rostock
Institut für Biowissenschaften/Mikrobiologie
Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät
Universität Rostock

Tag der öffentlichen Verteidigung: 17. November 2008

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis		7
I	EINLEITUNG	9
1.1.	Das Pankreaskarzinom	9
1.1.1.	Ätiologie und Pathogenese.....	9
1.1.2.	Diagnostik und Therapie.....	10
1.2.	Das Immunsystem	11
1.2.1.	Zellen des nicht-adaptiven Immunsystems.....	11
1.2.2.	Zellen des adaptiven Immunsystems.....	13
1.3.	Tumorimmunologie	15
1.3.1.	Antitumorale Reaktionen des Immunsystems.....	15
1.3.2.	Tumorantigene.....	17
1.3.3.	Immuntoleranz und Tumorescapemechanismen.....	18
1.4.	Immuntherapeutische Strategien zur Behandlung von Tumoren	21
1.4.1.	Passive humorale Immuntherapie: Applikation von monoklonalen, rekombinanten Antikörpern oder Immunkonjugaten.....	21
1.4.2.	Passive zelluläre Immuntherapie: adoptiver Transfer aktivierter Immunzellen.....	22
1.4.3.	Aktive spezifische Immuntherapie: Vakzinierungsstrategien mit Tumorzellen oder Tumor-assoziierten Antigenen.....	23
1.4.4.	Aktive unspezifische Immuntherapie: Applikation immunstimulierender Moleküle oder Zytokine.....	24
1.4.4.1.	<i>Die bakterielle Immuntherapie: ein aktiv, unspezifischer Therapieansatz</i>	25
II	ZIELSTELLUNG	27
III	MATERIAL UND METHODEN	28
3.1.	Geräte und Materialien	28
3.1.1.	Verbrauchsmaterialien.....	28
3.1.2.	Chemikalien.....	28
3.1.3.	verwendete Kits.....	29
3.1.4.	verwendete Antikörper.....	29
3.1.4.1.	<i>Isotypkontrollantikörper für die Durchflusszytometrie</i>	29

3.1.4.2.	<i>Spezifische Antikörper für die Durchflusszytometrie</i>	30
3.1.4.3.	<i>Antikörper für die Immunhistochemie</i>	30
3.1.5.	Puffer und Lösungen	30
3.1.6.	Geräte	30
3.1.7.	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	31
3.1.8.	Bakterienstämme und bakterielles Lysat	31
3.1.9.	Zelllinien und Kulturmedien	32
3.1.9.1.	<i>Humane Zellen</i>	32
3.1.9.2.	<i>Murine Zellen</i>	32
3.1.10.	Versuchstiere	32
3.2.	Tierexperimentelle Methoden	33
3.2.1.	Tiermodell	33
3.2.2.	Infektionsmodell	33
3.2.3.	Anästhesie, Organentnahme und Gewebeasservierung	34
3.2.4.	Rechallenge-Experimente	35
3.2.5.	Vollblut- und Blutplasma-Analytik	35
3.2.5.1.	<i>Blutbild</i>	35
3.2.5.2.	<i>Differentialblutbild</i>	35
3.2.5.3.	<i>Bestimmung von Enzymen im Blutplasma</i>	36
3.2.5.4.	<i>Zytokinbestimmung im Blutplasma</i>	36
3.3.	Mikrobiologische Methoden	37
3.3.1.	Einstellung und Kontrolle des Inokulums	37
3.3.2.	Bakterientiterbestimmung in Blut, Leber und Lunge	37
3.3.3.	Adhärenz und Internalisierung	38
3.3.4.	Live/Dead Cytotoxicity Viability Assay	38
3.3.5.	Bestimmung extrazellulärer LDH im Zellkulturüberstand	39
3.4.	Zellbiologische Methoden	40
3.4.1.	Kultivierung, Passagieren, Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	40
3.4.2.	Zellzahlbestimmung	40
3.4.3.	Isolierung von Effektorzellen der Immunantwort	41
3.4.3.1.	<i>Isolierung von PBMC aus Vollblut</i>	41
3.4.3.2.	<i>Isolierung von Leukozyten aus Milzgewebe</i>	41
3.4.3.3.	<i>Isolierung von Lymphozyten aus Lymphknoten</i>	41
3.4.4.	Durchflusszytometrie	41
3.4.4.1.	<i>Funktionsprinzip</i>	41

3.4.4.2.	<i>Apoptosenachweis mittels Sub-G1-Peak</i>	42
3.4.4.3.	<i>Analyse von Oberflächenantigenen in Blutleukozyten</i>	43
3.4.4.4.	<i>Nachweis von Foxp3 in regulatorischen T-Zellen</i>	43
3.4.4.5.	<i>Analyse von Oberflächenantigenen in Splenozyten</i>	44
3.4.5.	Untersuchung der Reaktivität von Lymphozyten gegenüber Zielzellen.....	44
3.4.5.1.	<i>ELISpot-IFN-γ Assay</i>	44
3.4.6.	Analyse der lytischen Aktivität von Lymphozyten gegenüber Zielzellen.....	45
3.4.6.1.	<i>LDH-Zytotoxizitätsassay</i>	45
3.4.6.2.	<i>Zytotoxizitäts-/Apoptosemessung</i>	45
3.4.6.3.	<i>Analyse der lytischen Aktivität mittels Propidiumjodidfärbung</i>	46
3.5.	Histologische Methoden	47
3.5.1.	Histomorphologie.....	47
3.5.1.1.	<i>HE-Färbung</i>	47
3.5.1.2.	<i>As-D Färbung</i>	47
3.5.2.	Immunhistochemie.....	48
3.6.	Experimentelles Protokoll	49
3.6.1.	Versuchsgruppen.....	49
3.6.2.	Versuchsablauf.....	49
3.7.	Statistik	50
IV	ERGEBNISSE	51
4.1.	Untersuchungen zum Wirkungsverhalten von <i>S. pyogenes</i> auf Zielzellen	51
4.1.1.	Adhärenz- und Internalisierungsverhalten.....	51
4.1.2.	Qualitative und quantitative Apoptose- und Nekrosebestimmung in Tumorzellen.....	53
4.1.3.	Zusammenfassung.....	57
4.2.	Untersuchungen zur therapeutischen Wirksamkeit von <i>S. pyogenes in vivo</i>	58
4.2.1.	Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zur Bestimmung der maximal tolerablen Dosis für die Antitumorthherapie.....	58
4.2.2.	Vergleich der therapeutischen Wirksamkeit des M49wt, der SLS μ und des Lysates beim Pankreaskarzinom.....	59

4.2.3.	Analyse des Wachstums von Tumoren in Rechallenge-Untersuchungen.....	61
4.2.4.	Einfluss der Antitumorthherapie auf hämatologische Parameter.....	63
4.2.5.	Untersuchung des Einflusses der Immuntherapie auf spezifische Enzyme im Plasma zur Beurteilung einer potentiellen Gewebs-schädigung.....	64
4.2.6.	Nachweis von proinflammatorischen Th ₁ /Th ₂ Zytokinen im Plasma nach therapeutischer Intervention.....	65
4.2.7.	Zusammenfassung.....	67
4.3.	Immunologischer Nachweis der therapeutischen Wirksamkeit von <i>S. pyogenes</i>.....	67
4.3.1.	Immunophänotypisierung von Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut und in der Milz mittels Durchflusszytometrie.....	68
4.3.2.	Einfluss der Antitumorthherapie auf regulatorische T-Zellen.....	72
4.3.3.	Nachweis der IFN- γ Sekretion aus Lymphozyten infolge der Kultivierung mit syngen Zielzellen.....	74
4.3.4.	Analyse der lytischen Aktivität von Lymphozyten gegenüber syngen Zielzellen.....	75
4.3.5.	Zusammenfassung.....	79
4.4.	Histomorphologie und Immunhistochemie des Pankreastumorgewebes.....	80
4.4.1.	Nachweis der therapieinduzierten Leukozyteninfiltration mit der As-D Färbung.....	83
4.4.2.	Immunhistochemischer Nachweis tumorinfiltrierender Lymphozyten.....	85
4.4.3.	Immunhistochemische Analyse zur Vaskularisierung von Tumoren mit anti-von-Willebrand-Faktor.....	87
4.4.4.	Zusammenfassung.....	88
V	DISKUSSION.....	89
5.1.	Aktive Immuntherapie beim Pankreaskarzinom.....	89
5.2.	Auswahl eines geeigneten Pankreaskarzinommodells für die Immuntherapie.....	91
5.3.	Vergleich der eigenen Ergebnisse mit der Literatur.....	93
5.3.1.	Zytotoxische Effekte von <i>S. pyogenes</i> auf murine und humane Pankreaskarzinomzellen.....	94
5.3.2.	Der Einfluss von <i>S. pyogenes</i> auf Panc02-Tumoren <i>in vivo</i>	95

5.3.3.	Induktion systemischer antitumoraler Immunantworten infolge lokaler mikrobieller Injektion.....	99
5.3.4.	Funktionelle Analysen zu antitumoralen Immunreaktionen nach der aktiven Immuntherapie	103
5.3.5.	<i>S. pyogenes</i> vermittelt partielle protektive Immunität gegen Panc02-Tumoren <i>in vivo</i>	108
5.3.6.	Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen dem murinen und dem humanen System in Bezug auf die Infektion mit <i>S. pyogenes</i>	110
5.3.7.	Kritische Bewertung der aktiven Immuntherapie mit <i>S. pyogenes</i> und zukünftige Untersuchungen zur Anwendbarkeit dieser Therapiestrategie.	111
VI	ZUSAMMENFASSUNG.....	114
VII	LITERATURVERZEICHNIS.....	116
VIII	LEBENS LAUF.....	133
IX	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	134
A	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	136
B	DANKSAGUNG.....	137

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin
A. dest.	Aqua destillata
ABC	Avidin-Biotin-Komplex (<i>Avidin-Biotin Complex</i>)
ADCC	antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (<i>antibody-dependent cell mediated cytotoxicity</i>)
AICD	aktivierungs-induzierter Zelltod (<i>activated-induced cell death</i>)
AK	Antikörper
ALAT	Alanin-Aminotransferase
ALP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin (Fluoreszenzfarbstoff)
APC	Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
BCG	Bacille Calmette-Guérin
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium
BRCA2	Breast cancer 2
BSA	Rinderserumalbumin (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
Calcein AM	Calcein Acetoxymethylester
CD	Cluster of Differentiation
CDC	Komplement-vermittelte Zytotoxizität (<i>complement dependent cytotoxicity</i>)
CDK	Cyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin-dependent kinase</i>)
CEA	Karzinomembryonales Antigen (<i>carcinoembryonic antigen</i>)
CFSE	5-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CFU	Kolonieformende Einheit (<i>colony forming unit</i>)
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten (<i>cytotoxic T lymphocytes</i>)
DAB	Diaminobenzidin
DC	dendritische Zellen (<i>dendritic cell</i>)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DPC	<i>deleted in pancreatic cancer</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (<i>epidermal growth factor Receptor</i>)
ELISpot-Assay	Enzyme-linked Immuno Spot Assay
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fetales oder Fötales Kälberserum
Foxp3	<i>Forkhead box Protein3</i>
GAS	Gruppe A Streptokokken
G-CSF	Granulozyten-Koloniestimulierender Faktor (<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>)
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen-koloniestimulierender Faktor (<i>granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i>)
HBV	Hepatitis B-Virus
Her-2/neu	<i>human epithelial receptor 2/neurological</i>

HPV	Humanes Papillom-Virus
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
hTERT	<i>Human telomerase reverse transkriptase</i>
i. p.	intraperitoneal
i. t.	intratumoral
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül (<i>intercellular adhesion molecule</i>)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKDC	<i>Interferon-producing killer dendritic cells</i>
IL	Interleukin
KIR	Killerzell-Ig-ähnlicher Rezeptor (<i>killer cell Ig-like receptor</i>)
LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzellen
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LFA	Lymphozyten funktions-assoziiertes Antigen (<i>lymphocyte function-associated antigen</i>)
MAGE	Melanom-assoziiertes Antigen (<i>Melanocyte antigen</i>)
MART	<i>Melanoma antigen recognized by T-cells</i>
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MUC1	Mucin1 (<i>mucin1</i>)
NK	Natürliche Killer (<i>natural killer</i>)
NKDC	Natürliche Killer dendritische Zellen (<i>Natural killer dendritic cells</i>)
OD	optische Dichte
PanIN	pankreatische intraepitheliale Neoplasien (<i>Pancreatic Intraepithelial Neoplasia</i>)
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PE	Phycoerythrin
PlyC ₁	Phagenlysin C1 (<i>phage lysine C₁</i>)
PRAME	<i>preferentially expressed antigen in melanoma</i>
RT	Raumtemperatur
s. c.	subkutan
SCID	<i>Severe Combined Immunodeficiency</i>
Sfb1	<i>streptococcal fibronectin binding protein 1</i>
SLS	Streptolysin S
SR-FLICA	Sulforhodamin Fluoreszenz-markierter Caspase-Inhibitor (<i>Sulforhodamine-Fluorescent-labeled Inhibitor of Caspases</i>)
TAA	Tumor-assoziierte-Antigene
TAP	<i>transporter associated with antigen presentation</i>
TGF	transformierender Wachstumsfaktor (<i>transforming growth factor</i>)
Th	T-Helferzellen
THY	<i>Todd-Hewitt yeast extract broth</i>
TIL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TRAIL	<i>TNF-Related-Apoptosis-Inducing-Ligand</i>
T _{reg}	regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zellrezeptor
VEGF	vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor (<i>vascular endothelial growth factor</i>)
vWF	von-Willebrand-Faktor

I EINLEITUNG

1.1. Das Pankreaskarzinom

1.1.1. Ätiologie und Pathogenese

Das Pankreaskarzinom zählt aufgrund seiner uncharakteristischen Frühsymptomatik und der damit verbundenen späten Diagnosestellung trotz verbesserter Therapiekonzepte noch immer zu den Tumorerkrankungen mit infauster Prognose (1). Laut Statistik des Robert Koch Instituts in Deutschland erkranken jährlich ca. 12.800 Menschen an bösartigen Veränderungen des Pankreas (2). In den meisten Fällen manifestiert sich die Erkrankung zwischen der sechsten und siebten Dekade, wobei Männer tendenziell häufiger betroffen sind (2, 3). Bauchspeicheldrüsentumoren machen 3 % aller krebisbedingten Neuerkrankungen aus. Die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten mit Pankreaskarzinom liegt bei unter 5 % (2, 4-6). Damit besitzt diese Erkrankung die schlechteste Prognose aller gastrointestinalen Tumorerkrankungen (7) und ist bei beiden Geschlechtern die fünfthäufigste krebisbedingte Todesursache in Deutschland (2). Die Ätiologie des Pankreaskarzinoms ist weitgehend ungeklärt. Zu den gesicherten Risikofaktoren zählen das Rauchen, eine lipidreiche Ernährung und eine lang verlaufende chronische Pankreatitis (2, 8, 9). Demgegenüber konnte bislang kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Alkoholabusus und Pankreaskarzinom nachgewiesen werden (10). Patienten nach Magenresektion oder mit Diabetes mellitus weisen ein erhöhtes Risiko der Karzinomentwicklung auf. Allerdings ist weder der kausale noch der zeitliche Zusammenhang geklärt. Ebenso wird die genetische determinierte Form des Pankreaskarzinoms nur bei ca. 10 % der Patienten beobachtet (9, 11-13).

Histologisch lassen sich verschiedene Formen des Pankreaskarzinoms unterscheiden, wobei Neoplasien des exokrinen Pankreas mit über 95 % überwiegen. Das duktaie Adenokarzinom stellt hierbei mit etwa 80-85 % die häufigste Form dar und ist in 70 % der Fälle im Pankreaskopf lokalisiert (14). Die Metastasierung erfolgt frühzeitig sowohl lymphogen als auch hämatogen in Leber, Lunge, Knochen und Gehirn. Ähnlich wie bei der Adenom-Karzinom Sequenz kolorektaler Tumoren (15, 16) geht man heute von einem Tumorprogressionsmodell von Normalgewebe über Hyperplasie und Dysplasie zum Karzinom unter Akkumulation verschiedener zytologischer, architektonischer und epigenetischer Veränderungen aus (6). Zur Charakterisierung der prämaligen Läsionen hat sich der Begriff der pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN)I-III etabliert (6, 17) (Abb. 1). Dabei unterscheidet man morphologisch drei verschiedene Differenzierungsgrade von der „*low grade pancreatic duct lesion*“ (PanIN 1A, 1B), über die „*high grade pancreatic duct lesion*“ (PanIN 2A, 2B) bis hin zum invasiven Karzinom. Zu den frühen prämaligen genetischen Alterationen zählen neben einer Überexpression der Rezeptortyrosinkinasen EGFR (epidermal growth factor receptor) und Her-2/neu (human epithelial receptor 2/neurological) auch Mutationen des Onkogens K-ras (12, 18). Im Verlauf der Karzinogenese kommt es zusätzlich zur funktionellen

Inaktivierung der Zellzyklus-regulierenden Tumorsuppressorgene $p16^{INK4a}$ und $p53$, sowie des durch *DPC4* (deleted in pancreatic cancer-4) kodierten Transkriptionsfaktors SMAD4 und des DNA-Reparaturproteins BRCA2 (Breast Cancer Type 2) (6, 12).

Bei mehr als 75 % aller Pankreastumoren wurden mindestens drei dieser genetischen Alterationen parallel nachgewiesen (19). Ferner ist eine Überexpression verschiedener Wachstumsfaktoren, wie TGF- (transforming growth factor) α , der Interleukine (IL) 1, 6, 8 sowie des Angiogeneseinduktors VEGF (vascular endothelial growth factor) beschrieben (1). Diese Kombination von Mutationen in Tumorsuppressor- und Onkogenen, Überexpression verschiedener Moleküle gemeinsam mit der konstitutiven Expression von Multidrug Resistenzgenen (20) tragen zur Resistenz der Tumoren gegenüber Chemo- und Radiotherapie bei. Gleichzeitig stellt die geringe Immunogenität der Tumoren eine Herausforderung bei der Entwicklung immuntherapeutischer Strategien dar.

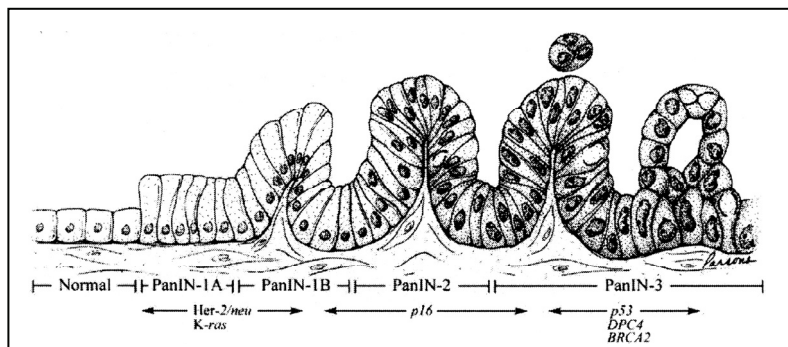


Abb. 1: Tumorprogressionsmodell des Pankreaskarzinoms. Schematische Darstellung der PanIN Läsionen und der akkumulierenden genetischen Alterationen während der Tumorprogression. Aus „Pancreatic cancer: basic and clinical aspects.“ (21).

1.1.2. Diagnostik und Therapie

Die Diagnosestellung des Pankreaskarzinoms erfolgt aufgrund der unspezifischen Symptomatik und dem Fehlen effektiver und gleichzeitig wenig invasiver Screening-Methoden meist erst in einem fortgeschrittenen und damit prognostisch ungünstigen Stadium (8, 22). Die Patienten klagen über Oberbauchschmerzen, Inappetenz, Gewichtsverlust sowie eine im Rahmen des Verschlussikterus nachweisbare, gestaute palpable Gallenblase (*Courvoisier-Zeichen*, 23). Diagnostisch kommt dann eine Kombination aus Laborwerten (Tumormarker CA 19-9, Pankreas- und Leberwerte), Sonographie, endoskopisch-retrograder Cholangiopankreatikographie (ERCP), Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT) und endosonographisch gestützter Feinnadelpunktion zum Einsatz (24).

Den gegenwärtig einzigen kurativen Ansatz für Patienten mit einem Pankreaskarzinom stellt die chirurgische Resektion dar (partielle Duodenopankreatektomie nach *Kausch-Whipple*, 25). Aufgrund häufig präklinisch lokal weit fortgeschrittener oder metastasierter Tumoren kann diese jedoch überhaupt nur in 15-20 % durchgeführt werden (24, 26), so dass

ein großer Teil der Patienten schon primär bei Diagnostizierung in palliativer Intention behandelt wird (27). Als Standardtherapeutikum wird dabei Gemcitabin (Difluorodesoxycytidin) eingesetzt, ein Pyrimidin-Antimetabolit, der seit 1996 in Deutschland zugelassen ist und gegenüber 5-Fluorouracil, welches bis 1997 das Chemotherapeutikum der Wahl darstellte, bessere Ergebnisse bezüglich der Lebensqualität und der medianen Überlebenszeit aufweist (27-29). Multiple Kombinationen, vor allem auf der Basis von Gemcitabin konnten bislang allerdings nur bescheidene Ergebnisse, mit medianen Überlebenszeiten von 5-10 Monaten erzielen (28, 29). Hierbei ist die Kombination mit dem EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib die erste Therapieform, welche gegenüber der Standardmonotherapie mit Gemcitabin einen Überlebensvorteil für Patienten erzielt. Eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität konnte bislang aber nicht beobachtet werden, so dass die Prognose für Patienten mit einem Pankreaskarzinom noch immer infaust ist (30, 31).

1.2. Das Immunsystem

Zu den wichtigsten Aufgaben des Immunsystems zählen die Verteidigung des Körpers gegen eindringende Mikroorganismen und die Generierung eines immunologischen Gedächtnisses. Für eine intakte Immunabwehr ist eine komplexe Interaktion zwischen Zellen des angeborenen, unspezifischen und Zellen des erworbenen, spezifischen Immunsystems notwendig.

1.2.1. Zellen des nicht-adaptiven Immunsystems (aus Janeway & Travers, 32)

Makrophagen

Makrophagen sind aus Blutmonozyten hervorgehende Zellen, die zusammen mit gewebe-spezifischen, sessilen Makrophagen (z. B. Kupffer'sche Sternzellen in der Leber, Histiocyten im Bindegewebe) das mononukleäre Phagozytensystem bilden. Zu den wichtigsten Aufgaben der Makrophagen gehört die Phagozytose von Zielzellen, die über spezielle Strukturerkennungsrezeptoren auf der Zelloberfläche ausgelöst wird. Über die Sekretion löslicher Mediatoren, wie Zytokine (IFN- (Interferon) γ , TNF- (Tumor Nekrose Faktor) α , IL-12, IL-1) greifen sie zusätzlich regulierend in verschiedenste Abwehrmechanismen ein. Als antigenpräsentierende Zellen (APC) können Monozyten und Makrophagen Antigene aufnehmen und prozessieren, diese über den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, Major Histocompatibility Complex) den T-Zellen in sekundären lymphatischen Geweben (z. B. Lymphknoten) präsentieren, und damit spezifische zelluläre und humorale Immunantworten initiieren. Makrophagen phagozytieren ferner auch körpereigene, gealterte oder tote Zellen, wie z. B. Erythrozyten.

Granulozyten

Entsprechend ihrem Färbeverhalten unterscheidet man basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten. Sie kommen in Blut, Knochenmark und verschiedensten Geweben vor und gehören neben Monozyten und Makrophagen ebenfalls zu den Phagozyten, die an der primären unspezifischen Abwehr beteiligt sind. Die Mehrzahl (circa 70 %) der Granulozyten sind Neutrophile mit segmentkernigen Zellkernen. Sie können nach Stimulierung durch Chemokine aus dem Blut in das Gewebe migrieren und Zielzellen mittels Phagozytose direkt eliminieren. Darüber hinaus können Neutrophile über ihre Fc γ -Rezeptoren auch opsonisierte Antikörper-gebundene Partikel, wie z. B. verkapselte, Bakterien phagozytieren. Der Abbau von Granulozyten erfolgt in Leber oder Milz durch gewebsspezifische Makrophagen.

Dendritische Zellen (DC, dendritic cells)

DC sind die wichtigsten APC und kommen ubiquitär in verschiedensten Geweben in niedriger Anzahl vor. Sie gelangen über das Blut in die Gewebe, wo sie Antigene pinozytisch oder rezeptorvermittelt aufnehmen und prozessieren können. Nach einem Antigenkontakt oder dem Einwirken inflammatorischer Stimuli migrieren sie als mature Zellen aus den Geweben in die sekundären lymphatischen Gewebe (Lymphknoten, Milz) zurück, präsentieren die zu Peptiden abgebauten Antigenfragmente über den MHC-Komplex und besitzen die Fähigkeit zur T-Zellstimulation. Gleichzeitig werden kostimulatorische Moleküle (B7-Moleküle) auf der Zelloberfläche vermehrt exprimiert und Zytokine sezerniert. Abhängig vom sezernierten Zytokin beeinflussen sie die T-Zellen hin zu einer Th₁- oder Th₂-Antwort oder können z. B. eine Anergie autoreaktiver T-Zellen induzieren.

Natürliche Killer (NK)-Zellen

NK-Zellen zirkulieren im Blut. Sie müssen nicht aktiviert werden, jedoch wird ihre Aktivität durch Zytokine (IL-12) oder Interferone (IFN- α , IFN- β , IFN- γ) gesteigert, die von Makrophagen sezerniert werden. Nach Aktivierung sezernieren die NK-Zellen Monozyten-, Makrophagen- und T-Zell-rekrutierende Chemokine. Zur Erkennung und Lyse von Zielzellen durch NK-Zellen sind zwei verschiedene Mechanismen wirksam. Dabei handelt es sich um die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) sowie die natürliche Zytotoxizität, bei der NK-Zellen mit Granzym und Perforin gefüllte lytische Granula sezernieren, die in Zielzellen den sofortigen Zelltod auslösen (33). Daneben sind NK-Zellen in der Lage, in der Zielzelle Apoptose durch das Fas/Fas-Ligand-System, sowie über TNF oder TRAIL (TNF-Related-Apoptosis-Inducing-Ligand) zu induzieren.

NKT-Zellen

NKT-Zellen haben sowohl Eigenschaften von NK- als auch von T-Zellen. Sie besitzen einen T-Zellrezeptor und produzieren IFN- γ , vermitteln ihre Zytotoxizität aber nicht MHC-restringiert. Sie können daher weder dem angeborenen, noch dem erworbenen Immunsystem zugeordnet werden. Sie stehen zwischen diesen beiden Systemen und gelten als Vermittler zwischen ihnen. NKT-Zellen können APC über IFN- γ aktivieren und die Proliferation von NK-Zellen stimulieren. Außerdem können sie aber auch T-Zellen über Zytokine wie IFN- γ oder IL-4 in Richtung Th₁- oder Th₂-Antwort beeinflussen und B-Zellen aktivieren.

1.2.2. Zellen des adaptiven Immunsystems

T-Helferzellen (Th-Zellen)

Th-Zellen sind Zellen der spezifischen Immunität. Sie sind Lymphozyten, die den α/β T-Zellrezeptor (TZR) CD3 und CD4 exprimieren. Th-Zellen binden an Peptide auf APC, die von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden. Dadurch kommt ein spezifischer Kontakt von APC und T-Zelle zustande, der die Aktivierung der Th-Zellen zur Folge haben kann. Diese Aktivierung führt unter anderem zur Sekretion von Zytokinen, über die Th-Zellen regulierend wirken können. Unterschiede im Zytokinsekretionsmuster haben zur Differenzierung von zwei Subpopulationen, den Th₁-Zellen und den Th₂-Zellen geführt. Th₁-Zellen sezernieren IL-2 und IFN- γ und vermitteln zelluläre Immunantworten, z. B. durch die Aktivierung von Makrophagen. Zudem werden auch zytotoxische T-Zellen zur Proliferation angeregt. Th₂-Zellen fördern dagegen spezifisch die humorale Immunität durch Stimulation von B-Lymphozyten zur Produktion von Antikörpern (AK). Wichtige Th₂-Zytokine sind IL-4, IL-5 und IL-10. IL-4 sorgt bei der Aktivierung von B-Zellen für die Bildung von neutralisierenden Antikörperklassen (IgA, IgG, IgE). Th₂-Zellen können B-Zellen dabei sehr stark anregen. Der größte Teil der Effektor Th-Zellen, die während der klonalen Expansion generiert werden, ist kurzlebig und stirbt durch aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD, activated-induced cell death). Einige Zellen differenzieren jedoch zu Gedächtnis- (Memory) Zellen, die bei erneutem Kontakt mit dem identischen Antigen sofort aktiviert werden und Immunreaktionen auslösen können.

Zytotoxische T-Zellen (CTL, cytotoxic T lymphocytes)

CTL tragen neben dem α/β TZR CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimere an ihrer Oberfläche. Im Gegensatz zu den Th-Zellen erkennen CTL intrazelluläre Peptide, die von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der APC präsentiert werden. Die Aktivierung von CTL erfolgt bei hoher Expressionsdichte der B7-Moleküle entweder direkt, oder indirekt durch Kostimulation von Th-Zellen. Nach Aktivierung können CTL ihre zytotoxischen Effekte gegenüber den Zielzellen, ähnlich wie NK-Zellen, über zwei Mechanismen ausüben. Ein Weg führt über den Perfo-

rin/Granzym-Weg. Der zweite Weg beruht auf der konstitutiven Expression von Fas-Ligand, wodurch in Fas-positiven Zielzellen die Apoptose induziert werden kann. Außerdem können CTL durch Sekretion von IFN- γ , TNF- α und TNF- β weitere Effektorzellen (z. B. Makrophagen) stimulieren und damit Immunreaktionen verstärken. Die Aktivierung der CTL kann durch die Differenzierung zu Memory-T-Zellen ebenfalls, wie bei den Th-Zellen, zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses führen.

Regulatorische T-Zellen (T_{reg} , regulatory T cells)

T_{reg} sind eine Subpopulation von CD4⁺ T-Zellen, die konstitutiv die IL-2-Rezeptor α -Kette (CD25), sowie den Transkriptionsfaktor Foxp3 (Forkhead box protein 3) exprimieren. Sie sind durch einen hypoproliferativen Phänotyp charakterisiert und physiologisch an der Aufrechterhaltung der immunologischen Selbst-Toleranz durch aktive Suppression autoreaktiver T-Zellpopulationen beteiligt. Sie sezernieren nur sehr geringe Mengen IFN- γ , aber große Mengen an TGF- β und IL-10 (34). Nach antigenspezifischer Aktivierung können T_{reg} die Proliferation und Zytokinsekretion von aktivierten T-Zellen stimulationsunabhängig inhibieren (35) und somit auch zytolytische Effekte von (Th₁-) Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) neutralisieren (36). Für die T-Zellsuppression ist ein direkter, aber zytokinunabhängiger Zell-Zellkontakt notwendig (35, 37). Weiterhin ist bekannt, dass T_{reg} die Zytokinsekretion, Proliferation und zytotoxische Aktivität von NKT-Zellen blockieren können (37).

$\gamma\delta$ T-Zellen

Die $\gamma\delta$ T-Zellen unterscheiden sich von den $\alpha\beta$ T-Zellen in ihrer Häufigkeit, Spezifität, im Expressionsmuster der CD4- und CD8- Korezeptoren und der Funktionsweise. Sie kommen primär in Schleimhäuten und Epithelien vor. Neben zytotoxischen Eigenschaften mit der Fähigkeit zur direkten Zelllyse durch Expression von Perforin und Serin-Esterasen (38, 39) besitzen $\gamma\delta$ T-Zellen auch immunmodulatorische Eigenschaften, die vor allem über Zytokine vermittelt werden.

B-Zellen

B-Zellen zirkulieren als Vorläuferzellen durch Blut und lymphatische Gewebe. Die Aktivierung der Zellen erfolgt durch Bindung spezifischer Antigene an die Ig-Rezeptoren, deren Aufnahme und intrazelluläre Prozessierung, sowie der Wechselwirkung mit antigenspezifischen Th-Zellen. Dies führt zur Expression des B-Zell stimulierenden CD40-Liganden auf der T-Zelle und zur Sekretion von Zytokinen (IL-4, IL-5, IL-6). Anschließend differenzieren die klonal expandierten Zellen zu AK-sezernierenden Plasmazellen oder Gedächtnis-B-Zellen, die bei erneutem Antigenkontakt durch APC reaktiviert werden können und schnell AK produzieren.

1.3. Tumorimmunologie

1.3.1. Antitumorale Reaktionen des Immunsystems

Bereits zu Beginn des letzten Jahrhunderts postulierte Paul Ehrlich die Hypothese einer körpereigenen Tumorbekämpfung. Nach seiner Vorstellung war die maligne Transformation von Zellen ein häufiges Ereignis. Die vom Immunsystem als „fremd“ erkannten Zellen würden jedoch eliminiert, so dass es erst nach Überwindung der Immunabwehr zu einer Manifestation der Neoplasie kommt (40). Nachdem diese Thematik -parallel zu den Erfolgen der Chemo- und Strahlentherapie- zunächst einige Jahre wenig bearbeitet wurde, beschrieben mit zunehmend besserem Verständnis für die Funktionen und Prozesse des Immunsystems 1957 Burnet und Thomas die Theorie der „Immunosurveillance“, also der Überwachung von Tumoren durch das Immunsystem (41). Sie besagt, dass das humane Immunsystem maligne Zellen erkennen und abtöten kann (41, 42). Dieses Konzept wurde allerdings zunächst sehr kritisch gesehen. Erst durch den zusätzlichen Erkenntnisgewinn über Tumor-Wirt-Interaktionen auf molekularer Ebene traf die Möglichkeit der Immunüberwachung wieder in den Vordergrund.

Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass sowohl Mechanismen der angeborenen als auch der erworbenen Immunität an der Tumorkontrolle beteiligt sind. Zu den wichtigsten Effektorzellen der angeborenen Immunabwehr zählen dabei neben den Makrophagen, vor allem die NK-Zellen, die Tumorzellen auch ohne vorherige Sensibilisierung und Antikörperbildung erkennen und abtöten können. Diese natürliche Zytotoxizität kann so zu einer schnellen und direkten Lyse von Zielzellen führen. Die Aktivierung der NK-Zell-Zytotoxizität unterliegt komplexen Interaktionen von NK- und Zielzellen, die u. a. durch aktivatorische (z. B. c-type Lektin-Rezeptoren NKG-2D, killer cell Ig-like receptor (KIR)2DS, CD16, Leukozytenintegrin LFA-1, CD40L) und inhibitorische Faktoren (z. B. KIR2DL, CD94) sowie durch Adhäsionsmoleküle (Integrine, Selektine) reguliert werden. Sie kann demnach nicht ausschließlich durch die von Kärre und Ljunggren formulierte „missing self“ Hypothese erklärt werden. Demnach erkennen NK-Zellen Zielzellen an einem Verlust oder der Alteration von MHC-Klasse-I Oberflächenmolekülen, also an dem „fehlenden Selbst“ statt am „Fremd“ (43, 44).

Demgegenüber sind die Mechanismen der adaptiven antitumoralen Immunität besser beschrieben. So ist heute bekannt, dass diese Immunantworten sowohl durch zelluläre als auch durch humorale Mechanismen vermittelt werden können (42). Die wichtigste Form der immunologisch-vermittelten Tumoralabwehr stellt hierbei die spezifische zelluläre Zytotoxizität dar, bei der MHC-Klasse-I restringierte Antigene auf Tumorzellen durch CD8⁺ T-Zellen erkannt werden. Für die Proliferation und Aktivierung aller Effektorfunktionen benötigen periphere T-Zellen zwei Signale. Während Signal 1 die Antigenspezifität der Aktivierung durch den TZR nach Erkennung des Peptid-MHC Komplexes bedingt, wird Signal 2 durch antigen-unspezifische kostimulatorische Signale weitergeleitet. Deren Liganden werden

ausschließlich auf professionellen APC exprimiert (32). Zu den kostimulatorischen Molekülen auf Seiten der APC zählen neben CD40 vor allem die B7-Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86). Während B7.2 konstitutiv exprimiert wird, erfolgt die Hochregulation von B7.1 erst im Verlauf einer Immunreaktion. Der Ligand von B7 auf den T-Zellen ist CD28, welches als Homodimer konstitutiv auf der T-Zelloberfläche exprimiert wird. Eine Stimulierung von CD28 durch die Liganden zusammen mit dem TZR resultiert in einer vollständigen Aktivierung der naiven T-Zellen. Das Fehlen dieser B7-CD28 Interaktion führt zur T-Zellanergie, ein Zustand in dem die Zelle auf eine Aktivierung nicht mehr reagiert. Nach Aktivierung kommt es zur Zellproliferation mit Induktion von Zytokinen (IL-2) und deren Rezeptoren (IL-2R), sowie von anti-apoptotischen Molekülen mit nachfolgender Differenzierung zu Effektorzellen (Abb. 2). Sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ T-Zellen benötigen im Stadium ausdifferenzierter aktivierter Effektorzellen bei erneutem Antigenkontakt keine weitere Kostimulation. Zu den wichtigsten Funktionen von Effektor T-Zellen gehört das Töten von Tumorzellen. CTL können in periphere Gewebe wandern und Tumorzellen direkt lysieren oder eine Apoptose induzieren. $CD4^+$ -Zellen differenzieren zu Th-Zellen. Als Th_1 -Zellen können sie u. a. nach Sekretion von $IFN-\gamma$ Makrophagen aktivieren, die durch Produktion reaktiver Metabolite die Tumorabwehr unterstützen. Th_2 -Zellen aktivieren durch IL-4-Freisetzung die humorale Achse des Immunsystems, indem B-Zell-Klone antigenspezifisch Antikörper gegen Tumorzellen produzieren. Durch Komplementaktivierung, Opsonisierung und ADCC können Tumorzellen ebenfalls abgetötet werden. Diese Mechanismen spielen im Rahmen der Tumorabstoßung aber eine eher untergeordnete Rolle.

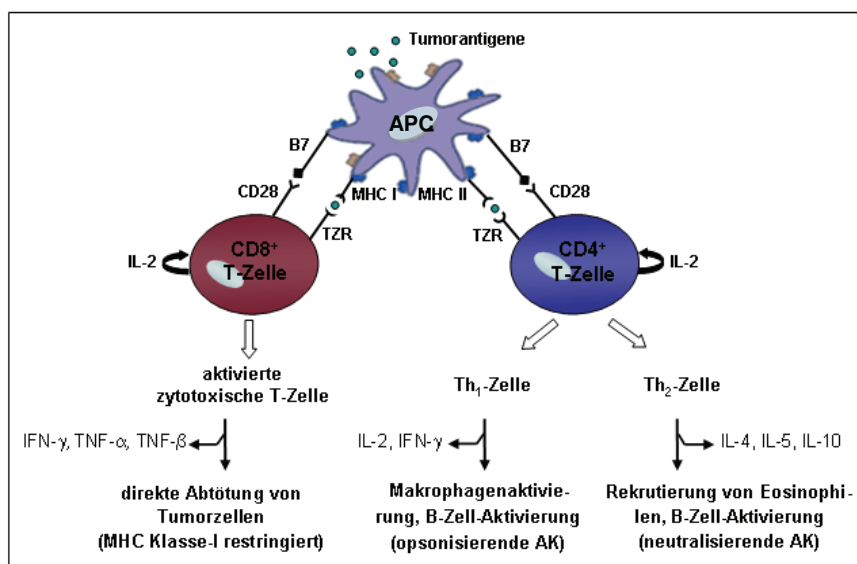


Abb. 2: Interaktionen bei der T-Zell-vermittelten Abwehr von Tumorzellen.

1.3.2. Tumorantigene

Die Entstehung von Tumoren erfolgt durch progressives Wachstum einer einzigen transformierten Zelle, die aufgrund veränderter Antigenexpression der Kontrolle des Immunsystems entkommen ist. Die Pionierarbeiten von Thierry Boon und seinen Mitarbeitern haben gezeigt, dass experimentelle Tumoren durch T-Zellen, die punktmutierte tumorspezifische Antigene erkennen, abgestoßen werden (45). Basierend auf diesen Untersuchungen konnten in den letzten Jahren eine Vielzahl Tumor-assoziiierter-Antigene (TAA) identifiziert werden. Sie werden hinsichtlich der Expressionsmuster in normalen und neoplastischen Geweben wie folgt unterteilt (46-48):

Tumor-spezifische Antigene (Cancer-Testis Antigene)

Embryonale Gene, die in ihrer Expression auf Testisgewebe, gelegentlich die Plazenta, beschränkt sind und normalerweise im adulten Organismus nicht exprimiert werden. Da sie jedoch in einigen Tumorentitäten nachweisbar sind, fungieren sie als Antigene. Ein gut charakterisiertes Beispiel ist die MAGE (Melanocyte antigen) - Genfamilie in Melanomen, in denen MAGE1-Peptide von CD8⁺-spezifischen T-Zellen erkannt werden.

Differenzierungsantigene

Einige Peptide, die nicht mutiert sind und gegenüber denen T-Zellen normalerweise tolerant sind, können ebenfalls spezifisch erkannt werden. Sie werden in Tumoren und den Geweben, aus denen sie entstehen, exprimiert. Zu diesen so genannten Differenzierungsantigenen zählen beispielsweise die Melanozytenantigene MART-1/Melan-A (Melanoma antigen recognized by T-cells) (MHC-Klasse-I und -II restringiert) und Tyrosinase (MHC-Klasse-II restringiert).

Strukturalterierte Antigene

Antigene dieser Gruppe entstehen durch Punktmutationen oder Translokationen in normalen Genen. Die resultierende Alteration des Gens steht oft mit der Tumorentstehung oder Tumorprogression in Verbindung. So wurde z. B. in 90 % aller Pankreastumoren eine aktivierende Mutation des Protoonkogens *K-ras* nachgewiesen (49). Diese kann nach Aktivierung verschiedene Mechanismen des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung beeinflussen. Zusätzlich weisen Tumoren häufig Mutationen im *p53* Tumorsuppressorgen auf, dessen Inaktivierung zu einer Störung der Zellzyklusregulation und der Apoptoseinduktion führt. Weitere Antigene sind mutierte Cyclin-abhängige Kinase 4 (CDK, cyclin-dependent kinase), β -Catenin und Caspase 8. Die Mutation der CDK4 führt dazu, dass der Zellzyklusregulator p16 nicht mehr binden kann, woraufhin es ebenfalls zu unkontrolliertem Zellwachstum kommt. Als Konsequenz der β -Catenin Mutation wird das Protein stabilisiert, bindet an Transkriptionsfaktoren und fördert bei gleichzeitiger Inhibition der Apoptose die

Proliferation von Zellen. Eine Punktmutation der Caspase 8 alteriert die Apoptoseinduktion über Fas und TNF-Rezeptoren durch extrazelluläre Signale.

Überexprimierte (Tumor-) Antigene

Diese Antigene entstehen durch verstärkte Expression der auch im gesunden Gewebe vorhandenen Proteine sowie durch deren posttranslationale Modifikation. Sie weisen keine Tumorspezifität auf. Zu ihnen zählen z. B. hTERT (Human telomerase reverse transkriptase), die katalytische Untereinheit der in Tumoren überexprimierten Telomerase, sowie Survivin, Her-2/neu und PRAME (preferentially expressed antigen in melanoma), welches in den unterschiedlichsten Tumoren nachgewiesen wurde. Demgegenüber ist die Expression des Karzinoembryonalen Antigens (CEA, carcinoembryonic antigen), ein Glykoprotein aus der Immunglobulinsuperfamilie, eher auf epitheliale und gastrointestinale Tumoren, wie das Pankreaskarzinom, beschränkt. CEA ist das bekannteste und am besten charakterisierte Tumorantigen. Peptidsequenzen von CEA, die von CTL erkannt werden, wurden beschrieben (50). Dies gilt in vergleichbarer Weise für das Muzin 1 (MUC1, mucin 1) das u. a. in Brust-, Ovar- und Pankreaskarzinomen verstärkt exprimiert wird und in veränderter Glykosylierungsform vorliegt. Eine Sonderstellung nimmt auch das p53 ein, welches als Onkoprotein in Tumoren überexprimiert ist und dadurch humorale und zelluläre Immunabwehrmechanismen hervorrufen kann. So führte z. B. der adoptive Transfer p53-Peptidspezifischer CTL bei p53-überexprimierenden Tumoren zu einer signifikanten Tumorerstörung (51).

Virale Antigene

Viele Tumorerkrankungen sind mit viralen Infektionen assoziiert. So werden z. B. das HBV (Hepatitis B-Virus) und das HPV (Humanes Papillom-Virus) als ätiologische Faktoren für das hepatozelluläre Karzinom bzw. das Zervixkarzinom angesehen (52, 53). Deren Tumoren tragen an ihrer Zelloberfläche virale Proteine, im Falle der HPV-induzierten Tumoren z. B. das E7-Onkoprotein, gegen das spezifische CTL nachgewiesen wurden (53).

1.3.3. Immuntoleranz und Tumorescapemechanismen

Trotz der veränderten Antigenexpression von Tumoren bleibt eine effektive antitumorale Immunantwort in den meisten Fällen aus. Viele Tumoren haben Mechanismen entwickelt, mit denen sie sich der Überwachung durch das Immunsystem entziehen. Das Hauptproblem stellt dabei eine tumorspezifische Toleranz dar, ein Status bei dem die Effektorzellen des Immunsystems nicht gegen fremde Antigene oder entartete Zellen des Organismus agieren bzw. aktiviert werden. Für die Toleranzinduktion stehen dem Tumor verschiedene Mechanismen, wie T-Zell-Anergie, Dysfunktion von T-Lymphozyten, Apoptose von aktivierten T-

Zellen, Immundeviation und immunsuppressive Zytokine zur Verfügung (47, 54). Darüber hinaus führen Tumor-Escapemechanismen indirekt ebenfalls zur Immuntoleranz.

Die Aktivierung von spezifischen Effektor T-Zellen erfolgt über zwei Signale: Bindung eines Peptid-MHC Komplexes an den TZR und Bindung von kostimulatorischen Molekülen an ihre Liganden auf der T-Zelloberfläche (siehe 1.3.1.). Eine initiale Aktivierung der T-Zellen ohne Anwesenheit kostimulatorischer Signale induziert T-Zellanergie, d. h. die Zelle erkennt spezifisch ein Antigen, führt jedoch keine Funktion aus. Bei Pankreastumoren konnte gezeigt werden, dass APC in der Tumorumgebung Antigene präsentieren, jedoch nur ungenügend kostimulatorische Moleküle (insbesondere B7.1) exprimieren und damit zur Anergie der T-Zellen führen (55). Darüber hinaus wird vermutet, dass Tumoren „Milieufaktoren“ produzieren, die lokal und auch in der Umgebung die Struktur von Oberflächenproteinen und damit die Funktion von T-Zellen modulieren. Diese Dysfunktion der T-Zellen betrifft sowohl den TZR, als auch intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle. Bei Pankreaskarzinompatienten wurde beispielsweise eine infolge der verminderten Expression der TZR ζ -Kette reduzierte Sekretion von IFN- γ und IL-4 nachgewiesen (56, 57), die zusätzlich zur Toleranz beiträgt. Die Dysfunktion der Immunzellen ist allerdings reversibel. Nach chirurgischer Resektion von malignen Tumoren wurden wieder normale Expressionen der TZR ζ -Kette bestimmt (58). Ebenso führt die Aktivierung von TIL mit IL-2 zu Heraufregulation des Moleküls (58).

Zwei weitere Mechanismen, die von Tumoren benutzt werden, um der Abstoßung durch das Immunsystem zu entkommen, hängen mit Apoptose zusammen. T-Zellen regulieren apoptotische Prozesse über die Interaktion von Fas (CD95) und dessen Liganden (CD95L). Viele Tumorzellen zeichnen sich durch eine verringerte Expression pro-apoptotischer Moleküle, vor allem des Fas-Rezeptors CD95 auf der Zelloberfläche aus, und verhindern damit eine T-Zell-induzierte Apoptose. Auf der anderen Seite führt die permanente Aktivierung der T-Zellen durch ein Antigen zur Heraufregulation von CD95 und CD95L. Dadurch kommt es in den Zellen zum AICD und tumorspezifische T-Zellen werden eliminiert.

Bei der Immundeviation wird die Immunantwort von einer Th₁-Antwort zu einer humoralen Th₂-Antwort gelenkt. Eine erfolgreiche Tumorregredienz, die vor allem durch die zelluläre Immunantwort mit den CTL vermittelt wird, kann damit unterbunden werden.

Über die Sekretion immunsuppressiv wirksamer Zytokine wird ebenfalls lokal Toleranz induziert und damit ein Proliferationsvorteil für den Tumor erzielt. IL-10 und TGF- β gehören zu den wichtigsten immunsuppressiven Zytokinen. Durch IL-10 wird eine proinflammatorische antitumorale Th₁-Immunantwort unterdrückt. Darüber hinaus verhindert IL-10 die Aktivierung von Makrophagen und die Expression kostimulatorischer Moleküle auf APC (59). Der immunsuppressive Effekt von TGF- β ist allerdings noch ausgeprägter. TGF- β inhibiert die Proliferation von T-Zellen durch Unterdrückung der IL-2 Synthese. Außerdem wird die Synthese

von IL-3 und GM-CSF (granulocyte macrophage-colony stimulating factor) gehemmt und damit das Wachstum hämatopoetischer Vorläuferzellen unterdrückt.

Ferner wird infolge der Sekretion von IL-10 und TGF- β auch die Infiltration CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T_{reg} gefördert (60). Die Prävalenz von T_{reg} konnte in Tumoren, Blut und drainierenden Lymphknoten von Patienten, darunter auch Pankreaskarzinompatienten, gezeigt werden (35, 61). Tumorzellen sind demnach in der Lage, T_{reg} aus dem Blut zu rekrutieren, wodurch immunologische Effektorzellen gehemmt und Immuntoleranzmechanismen verstärkt werden (7, 35). Für die Vermittlung der immunsuppressiven Funktion ist dabei vor allem der von Hori et al. 2003 erstmalig beschriebene Transkriptionsfaktor Foxp3 entscheidend, dessen Wirkung auf einer Inhibition T-Zell-stimulierender Zielgene beruht (62, 63). Die Expression von Foxp3 ist allerdings nicht, wie früher vermutet, ausschließlich auf CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen beschränkt. Erst kürzlich konnte die Arbeitsgruppe um Kunz nachweisen, dass der Transkriptionsfaktor auch in Pankreastumorgewebe und Zelllinien exprimiert wird, die dadurch zusätzlich immunsuppressiv wirken können (64).

Für verschiedene Tumorentitäten ist außerdem die Herunterregulation von MHC-Klasse-I Molekülen sowie eine fehlerhafte Prozessierung von Tumorantigenen durch die Defizienz der Transportproteine TAP (transporter associated with antigen presentation) beschrieben, die weitere Mechanismen der Immunevasion darstellen (7, 55, 65, 66). Die herabregulierte Expression der Transportproteine TAP-1 und TAP-2, die für den Transport von Peptiden in das endoplasmatische Retikulum verantwortlich sind, führt durch Verlust der MHC-Klasse-I Expression zur Zunahme der Tumorgenese und damit auch zur durch den Tumor vermittelten Toleranz. Die daraus resultierende verminderte Immunogenität der Tumorzellen ist insbesondere für das Pankreaskarzinom charakteristisch (s. auch Tab. 1).

Tab. 1: Mechanismen der Immunevasion beim Pankreaskarzinom (nach Laheru & Jaffee, (1)).

Strategie	Mechanismus	
	lokal	systemisch
Fehlen kostimulatorischer Moleküle/Anergie-Induktion	Herunterregulation von B7.1	Herunterregulation von B7-ICAM, CD40, LFA-3
Sekretion immunsuppressiv wirksamer Moleküle	IL-10, TGF- β , VEGF Cyclooxygenase-2	IL-1, IL-6, IL-10, TGF- β
Toleranzinduktion	Rekrutierung von T _{reg} zu dem Tumor	Deletion aktivierter, peripherer T-Zellen durch T _{reg}
Apoptoseregulation	Apoptoseinduktion in TIL über FasL, Herunterregulation von Fas auf Tumorzellen	Apoptoseinduktion in T-Zellen über FasL
Defekte Antigenpräsentation	Herunterregulation von MHC I Molekülen, β 2 Mikroglobulin, TAP auf Tumorzellen	nicht bekannt

1.4. Immuntherapeutische Strategien zur Behandlung von Tumoren

Mit dem Nachweis von Immunreaktionen gegen Tumoren konnte die Basis für die Entwicklung immuntherapeutischer Strategien geschaffen werden, die in den letzten Jahrzehnten zu einem festen Bestandteil im Gesamtkonzept der Behandlung maligner Erkrankungen geworden sind. Sie verfolgen das Ziel, Tumorzellen gezielt durch die Induktion einer spezifischen Immunantwort zu eliminieren und eine protektive Immunität gegenüber residuellen Tumorzellen sowie Metastasen zu vermitteln. Die Immuntherapie maligner Erkrankungen kann in aktive und passive Therapieverfahren unterteilt werden. Die aktive Immuntherapie beinhaltet die spezifische und unspezifische Generierung von zytotoxischen, zellulären oder humoralen Immunreaktionen. Bei der passiven Immuntherapie erfolgt der Transfer spezifischer, zytotoxischer Immunzellen oder tumorspezifischer Antikörper. Zelluläre Immunreaktionen führen durch direkte Zell-Zell-Interaktion oder über Antikörpervermittlung zu einer Zytolyse der Tumorzellen.

1.4.1. Passive humorale Immuntherapie: Applikation von monoklonalen, rekombinanten Antikörpern oder Immunkonjugaten

Eine immuntherapeutische Strategie basiert auf der Applikation von monoklonalen Antikörpern, deren antitumorale Wirksamkeit lange bekannt ist (67, 68). Die Basis für den therapeutischen Einsatz monoklonaler Antikörper wurde im Jahr 1975 durch die Entwicklung der Hybridomatechnik geschaffen (69). Antikörper-gebundene Tumorzellen können über NK-Zellen, mittels ADCC oder Komplement-vermittelter Zytotoxizität (CDC, complement dependent cytotoxicity) lysiert werden (70, 71). Für die Induktion einer effektiven T-Zellantwort mit Generierung eines immunologischen Gedächtnisses, werden die Antikörper häufig als Transportvehikel für andere zytotoxische Substanzen, wie Radionuklide (^{131}Jod , $^{90}\text{Yttrium}$), Chemotherapeutika und Toxine (Pseudomonas-Exotoxin A, Calicheamicin, Maytansinoid) eingesetzt (72, 73). Einer der ersten zugelassenen Antikörper war Rituximab, der heute alleine oder als Radioimmunkonjugat begleitend zur Chemotherapie gegen CD20-positive niedrigmaligne Non-Hodgkin-Lymphome eingesetzt wird (74). Beim Pankreaskarzinom erfolgte bislang in Studien die Kombination von Gemcitabin mit monoklonalen Antikörpern, wie Cetuximab, das gegen den EGF-Rezeptor gerichtet ist. Ebenfalls untersucht wurden Trastuzumab, das an den HER-2/neu-Rezeptor bindet, und Bevacizumab, das durch Bindung an VEGF die Aktivierung des VEGF-Rezeptors hemmt (75, 76). Einige der Kombinationstherapien zeigten zwar höhere Remissions- oder Krankheitsstabilisierungsraten und längere progressionsfreie Intervalle, im Vergleich zur Gemcitabin-Monotherapie konnte allerdings nur ein geringer Überlebensvorteil erzielt werden (18, 75).

Eine andere Möglichkeit besteht in der Fusion tumorspezifischer Antikörper mit einem Zytokin (z. B. IL-2, IL-12, GM-CSF), wodurch eine Erhöhung der Zytokinkonzentration im Tumormikromilieu erreicht wird (68). Auch bispezifische Antikörper werden zur Immuntherapie

eingesetzt. Sie werden entweder über chemische Konjugation beider parentaler Antikörper oder Antikörperfragmente (*Cross-Linking*) (77), über die Hybrid-Hybridom- (Quadrom-) Technologie (78) oder mithilfe rekombinanter Methoden (79) gewonnen. Diese rekombinanten Antikörper können sowohl Tumorantigene (z. B. EGFR, Her2, MUC1, CEA) als auch Antigene auf der Oberfläche von Effektorzellen, z. B. CD3 auf T-Zellen oder CD16 auf NK-Zellen, simultan binden (80). Bislang liegen jedoch nur sehr wenige experimentelle Daten beim Pankreaskarzinom vor (81, 82).

1.4.2. Passive zelluläre Immuntherapie: adoptiver Transfer aktivierter Immunzellen

Die adoptive Immuntherapie umfasst den Transfer von einer Immunität oder Tumoresistenz von einem Individuum auf ein anderes. Dieser kann z. B. durch die Gabe von tumorspezifischen T-Zellen oder heterogenen Immungemischen aus Zellen, alleine oder in Kombination mit Interleukinen, erfolgen. Der dabei ausgelöste therapeutische Effekt ist auf die zytotoxische Aktivität und die Freisetzung von Zytokinen, die andere Effektorzellen wie Monozyten und Granulozyten rekrutieren und aktivieren, zurückzuführen.

Die Anfänge der adoptiven Immuntherapie gehen auf die Arbeitsgruppe um Rosenberg zurück, die 1980 erstmals Zellen beschrieben, die Tumorzellen direkt, ohne MHC-Restriktion erkennen und lysieren können (83, 84). Diese Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK) können aus peripheren Blutleukozyten tumortragender Patienten gewonnen werden. Sie leiten sich primär von NK-Zellen ab, die durch Zugabe von hohen Mengen IL-2 *in vitro* aktiviert werden und in der Lage sind, entartete Zellen zu erkennen. LAK können Tumorzellen durch die Freisetzung von Granzymen und perforinhaltiger Granula lysieren und Apoptose in den Zielzellen induzieren (85). Problematisch ist jedoch deren geringe antitumorale Wirkung *in vivo* (86) und die Schwierigkeit der Gewinnung großer Zellzahlen. Dahingegen verfügen TIL über eine stärkere zytotoxische Wirkung. Diese autologen Lymphozyten werden aus Tumorgewebe isoliert, *in vitro* unter Stimulation mit IL-2 aktiviert und expandiert und anschließend dem Patienten reinfundiert. Die generierten Lymphozyten haben im Gegensatz zu den LAK vornehmlich einen CD3⁺ CD8⁺ Phänotyp (87). Entsprechend ist auch deren lytische Aktivität 50-100 mal höher als die von LAK Zellen. TIL vermitteln ihre Zytotoxizität über den TZR MHC-restringiert. Der therapeutische Einsatz ist aber auch durch die Schwierigkeit der Gewinnung ausreichend großer Zellzahlen limitiert.

Schließlich besteht die Möglichkeit autologe Vorläuferzellen von DC zu isolieren, *in vitro* zu stimulieren, mit entsprechenden Tumorantigenen zu beladen und im maturen Zustand zu reinfundieren. Experimentelle Studien zum Pankreaskarzinom haben gezeigt, dass DC eine T-Zell-vermittelte Tumorabstoßung induzieren können (71, 88). Bei dieser peptidspezifischen Immuntherapie müssen die individuell generierten DC jedoch zunächst mit dem entsprechenden Antigen ausgestattet werden und tumorspezifische Peptide müssen bekannt bzw.

vorhanden sein. Da für das Pankreaskarzinom jedoch nur wenige spezifische Tumorantigene beschrieben sind, ist der therapeutische Erfolg dieses Ansatzes limitiert (55). Dementsprechend erzielte eine klinische Studie MUC1 Peptid-beladener DC nur bescheidene Resultate bei Pankreaskarzinompatienten (89). Einen Erfolg versprechenderen Ansatz stellt die Beladung von DC mit Tumorzelllysaten dar, da die Vakzinpräparationen alle relevanten Tumorproteine und -peptide enthalten, ohne dass eine molekulare Charakterisierung der Strukturen notwendig ist. Außerdem reduzieren unfractionierte Tumorantigene das Risiko, dass der Tumor sich durch Mutation dem einzigen zum Pulsen verwendeten Epitop entzieht. So weisen verschiedene Arbeiten darauf hin, dass mit Tumorzelllysat gepulste DC eine polyklonale T-Zellexpansion induzieren, welche zur Aktivierung von CTL und damit verbunden zu einer effektiven Immunantwort gegen Pankreastumoren führt (88, 90).

1.4.3. Aktive spezifische Immuntherapie: Vakzinierungsstrategien mit Tumorzellen oder Tumor-assoziierten Antigenen

Durch die Identifikation von TAA konnten Therapieansätze entwickelt werden, die auf eine endogene, tumorspezifische Reaktion abzielen. Das Prinzip dieser Therapie beruht auf der Erhöhung der Antigenität und Immunogenität und geht auf Untersuchungen von Lindenmann und Klein zurück. Sie veröffentlichten 1967 eine Studie, in der sie Tumorzellen mit Influenzaviren infizierten und anschließend die Tumorzelllysate als Vakzine bei tumortragenden Mäusen einsetzten (91). Eine wesentliche Voraussetzung für den Erfolg dieses immuntherapeutischen Ansatzes stellt die Induktion effektiver T-Zellimmunantworten dar, welche tumorspezifische Peptide im Komplex mit MHC-Molekülen auf den Tumorzellen erkennen. Zur Immunstimulierung kommen Vakzine aus bestrahlten autologen Tumorzellen, Zellextrakten (Lysate), sowie gereinigten oder rekombinanten Antigenen zum Einsatz (71). So konnte beispielsweise in verschiedenen Modellen nachgewiesen werden, dass die Vakzinierung mit gentechnisch modifizierten Tumorzellen, die Zytokine (GM-CSF, IL-2) durch Infektion mit Viren sezernieren oder membrangebunden darbieten, zu einer Steigerung der Immunogenität der Tumorzellen führt (92, 93). Vergleichbare Ergebnisse wurden durch die Expression zusätzlicher kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche von Tumorzellen (B7-1, LFA-3) erhalten (93, 94). Ein anderer Ansatz besteht in der Polypeptidvakzinierung (z. B. mutiertes K-ras, Her2/neu), die aus Tumorzellen isoliert wurden. Diese können effektiv Peptid-spezifische CTL induzieren (95, 96).

1.4.4. Aktive unspezifische Immuntherapie: Applikation immunstimulierender Moleküle oder Zytokine

Immunologische Ansätze in der Tumorthherapie werden seit Ende des 19. Jahrhunderts eingesetzt (97). Damals konnte der New Yorker Chirurg William B. Coley zeigen, dass sich bestimmte Tumoren infolge lokaler bakterieller Infektionen zurückbildeten (98, 99). Er begann daraufhin, primär inoperable Sarkompatienten gezielt mit Bakterien bzw. bakteriellen Lysaten von *Serratia marcescens* und *Streptococcus pyogenes* zu behandeln und konnte zeigen, dass sich die Immunabwehr gegen Tumoren dadurch steigern ließ und es teilweise auch zur Regression kam (99, 100). Basierend auf diesen Beobachtungen wurden verschiedene Strategien der bakteriellen Immuntherapie generiert, auf die unter 1.4.4.1. näher eingegangen wird.

Bei derzeitigen Studien finden auch Zytokine als Aktivatoren der eigenen Anti-Tumor-Immunreaktion Anwendung. Vor über zwei Dekaden konnte die Arbeitsgruppe um Rosenberg bereits zeigen, dass die systemische Applikation hoher Dosen IL-2 zur Regression muriner Tumoren führt (101). Ausgehend von diesen initialen experimentellen Untersuchungen wurden in den letzten Jahren eine Vielzahl präklinischer und klinischer Studien durchgeführt (102-104). Besonders relevant sind in diesem Zusammenhang die Zytokine IL-2, IL-12 und GM-CSF (105). Die biologische Wirkung von IL-2 beruht auf der klonalen Expansion von T-Zellen. IL-2 stimuliert die Produktion weiterer Zytokine (z. B. IFN), steigert die Proliferation von B-Zellen und induziert die Zytotoxizität aktivierter Makrophagen. IL-12 bindet an seine Rezeptoren auf aktivierten NK- und T-Zellen und stimuliert diese Zellen zur IFN- γ Sekretion. Außerdem fördert IL-12 die selektive Reifung von aktivierten CD4⁺ Zellen zu Th₁ Zellen und von aktivierten CD8⁺ Zellen zu CTL (106). IL-12 ist damit ein entscheidender Initiator der zellvermittelten Immunität. Vergleichbares Potential besitzt auch das GM-CSF, welches vor allem von B- und T-Lymphozyten sowie von Makrophagen nach deren Aktivierung sezerniert wird (107). Die antitumoralen Effekte dieses Zytokins beruhen insbesondere auf einer gesteigerten Zytotoxizität von Lymphozyten gegenüber Tumorzellen sowie der Verstärkung der Immunogenität von Tumorzellen infolge der Aktivierung von DC, Makrophagen, Granulozyten und NKT-Zellen. Bislang wurden diese Zytokine als Adjuvans bei verschiedenen Vakzinierungsstrategien eingesetzt. In einigen Studien konnte eine Verstärkung der Antigenpräsentation und Stimulation der adaptiven Immunität über die Expansion spezifischer T-Zellen nachgewiesen werden (73).

1.4.4.1. Die bakterielle Immuntherapie: ein aktiv, unspezifischer Therapieansatz

Um die Gegenwart einer mikrobiellen Infektion nachzuahmen und so durch eine Stimulation des Immunsystems eine effektive, gegen den jeweiligen Tumor gerichtete Immunantwort zu erzielen, wurden unterschiedliche, auf dem Einsatz von Bakterien basierende Therapieansätze entwickelt. Dabei kommen den mikrobiellen Komponenten zwei entscheidende Funktionen zu: durch die Freisetzung lytischer Enzyme (Proteasen, Lipasen) von den Bakterien, sowie durch bakterielle Toxine (Exo-/Endotoxin) können Tumorzellen direkt getötet werden. Diese lokale Entzündung führt, unter gleichzeitiger Freisetzung proinflammatorischer Enzyme (z. B. G-CSF, granulocyte-colony stimulating factor), zur Rekrutierung von Zellen des nicht-adaptiven Immunsystems (Monozyten, Neutrophile) aus dem peripheren Blut in das Tumorgewebe. Nach der Infiltration können Immunzellen durch die Produktion von Proteasen und degradativen Enzymen ebenfalls direkt zur Eliminierung von Tumorzellen beitragen. In diesem Zusammenhang werden Tumorantigene freigesetzt, die von spezifischen Effektorzellen (vor allem CTL) erkannt werden können. Die Bakterien tragen damit über die Vermittlung von zellulären Immunreaktionen auch indirekt zur Antitumorimmunität bei (Abb. 3).

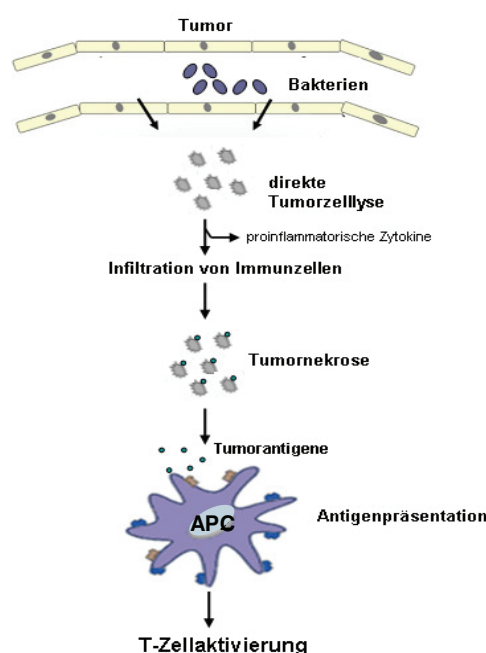


Abb. 3: Mechanismus der durch Bakterien-vermittelten Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen.

In den letzten Jahren wurde in experimentellen Ansätzen die immuntherapeutische Wirksamkeit verschiedener Bakterien untersucht. Zu den bekanntesten zählt hierbei die bakterio-lytische Therapie mit Sporen von attenuierten Bakterien der Gattung *Clostridium novyi*. So konnte von der Arbeitsgruppe um Vogelstein in mehreren *in vivo* Modellen bei verschiedenen Tumorentitäten gezeigt werden, dass die systemische Applikation der Sporen zur immun-vermittelten Tumorregression und damit verbundenen protektiven Immunität führt (108-110). Ferner wurde auch das therapeutische Potential von attenuierten Salmonellen sowie von

Bifidobakterien belegt (111). Die anaeroben Bakterien zeigen einen natürlichen Tropismus gegenüber soliden Tumoren und können antitumorale Immunantworten vermitteln (112-115). Entscheidend an der Vermittlung der Immunreaktion ist dabei auch die bakterielle DNA, die eine stark immunstimulatorische Wirkung besitzt (116, 117).

Bakterielle Lysate, wie Coley sie verwendet hatte, werden heute bei der Behandlung des oberflächlichen Harnblasen-Karzinoms eingesetzt. Hierbei wird ein schwach virulenter Stamm von *Mycobacterium bovis* (BCG, *Bacille Calmette-Guérin*) lokal in den Tumor appliziert (118). Der Wirkmechanismus von BCG beruht auf der Induktion von Th₁-Zytokinen, insbesondere TNF- α und IFN- γ , wodurch humorale, durch Th₂-Zellen vermittelte Antworten supprimiert werden (119). Dieses Verfahren hat sich seit der Einführung 1976 durch Morales als Standardtherapie früher Tumorstadien des Harnblasenkarzinoms etabliert (120).

Demgegenüber ist der alleinige Einsatz von *S. pyogenes* bei Tumorerkrankungen bislang noch nicht beschrieben. *S. pyogenes* gehört zur Gruppe A Streptokokken (GAS) und ist ein fakultativ anaerobes, nicht sporenbildendes, β -hämolisierendes Bakterium, von dem verschiedene Virulenzfaktoren beschrieben sind. Zu diesen zählen die Streptokinase, welche Fibrin auflöst, sowie die Toxine Streptolysin (SLS) O und S, welche neben Erythrozyten auch Leukozyten und Makrophagen durch Bildung von Poren in der Zellmembran effektiv lysieren können (121). Bakterien dieser Spezies können ein breites Spektrum von Infektionen verursachen (122, 123). Typischerweise besiedeln GAS die Schleimhaut (Rachen) und Haut (Gesicht, Unterschenkel) und verursachen dort lokal begrenzte eitrige Infektionen die meistens spontan ausheilen, jedoch mit einer Antibiotikatherapie verkürzt werden können. GAS adhären über die Fibronektin-bindenden Proteine F1 und SfbI an Zielzellen und können in Zielzellen internalisieren (124, 125). Je nach infizierendem GAS-Serotypstamm kann der Zellkontakt zytotoxisch verlaufen und starke Immunantworten auslösen, wobei in den Wirtszellen ein Zelltod ausgelöst wird, oder aber die Bakterien verhalten sich eher unauffällig und persistieren für längere Zeiträume in den Wirtszellen und -geweben unter schwächeren Ausprägungen der Immunantwort.

II ZIELSTELLUNG

Das Pankreaskarzinom zählt trotz verbesserter Therapiekonzepte noch immer zu den Erkrankungen mit infauster Prognose. Vor diesem Hintergrund sind in den letzten Jahren immunologische Therapiekonzepte immer mehr in den Fokus gerückt. Sie verfolgen das Ziel, eine endogene tumorantigenspezifische Immunantwort zu induzieren, um eine protektive Immunität gegenüber residuellen Tumorzellen sowie Metastasen zu vermitteln. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte dabei der Ansatz einer aktiven Immuntherapie mit Bakterien der Gattung *S. pyogenes* im syngenem, subkutanen Pankreaskarzinommodell der Maus entwickelt werden. Dazu wurden drei verschiedene Schemata im Hinblick auf deren therapeutische Wirksamkeit und somit potentielle klinische Anwendbarkeit analysiert. Folgende Fragestellungen sollten im Einzelnen beantwortet werden:

1. Charakterisierung der zytotoxischen Wirkung von *S. pyogenes* *in vitro*:

Gibt es im Vergleich zwischen humanen und murinen Pankreaskarzinomzellen Unterschiede im bakteriellen Adhärenz- und Internalisierungsverhalten? Induzieren die Bakterien serotypabhängig eine Lyse in den Zielzellen? Führt die Zelltodinduktion in den Tumorzellen zu Nekrose oder zu Apoptose?

2. Analyse des antitumoralen Potentials von *S. pyogenes* *in vivo*:

Bestehen Unterschiede im Hinblick auf Verträglichkeit, Toxizität und Antitumoraktivität zwischen einem Wildtypbakterium, einer Deletionsmutante, sowie einem bakteriellen LySAT? Gibt es Unterschiede im zeitlichen Verlauf der Behandlung der Panc02-Tumoren?

3. Phänotypische Charakterisierung immunologischer Effektorzellen *ex vivo*:

Kommt es infolge der lokalen Behandlung zu einer systemischen Immunstimulierung und können durch die einzelnen Behandlungsschemata immunologische Unterschiede im peripheren Blut, sowie der Milz detektiert werden? Welche Zellen des nicht-adaptiven bzw. adaptiven Immunsystems werden aktiviert bzw. induziert? Kommt es im Verlauf der Therapie zur Induktion von Th₁-und/oder Th₂-Zytokinen? Führt die lokale Immuntherapie zur T-Zellinfiltration in die Panc02-Tumoren? Können Unterschiede im zeitlichen Verlauf, sowohl lokal als auch systemisch beobachtet werden?

4. Funktionelle Untersuchungen zur Spezifität der antitumoralen Immunantwort:

Können spezifisch immunologische Effektor T-Zellen durch die Behandlung generiert werden und besitzen diese Zellen zytotoxisches Potential gegenüber Tumorzellen? Besteht eine zeitabhängige Spezifität der T-Zellen gegenüber Tumorzellen? Induzieren die Therapieschemata eine Kreuzreaktivität gegenüber verschiedenen Tumorentitäten? Vermittelt die Therapie eine dauerhafte protektive Immunität gegenüber Panc02 Zellen *in vivo*?

III MATERIAL UND METHODEN

3.1. Materialien und Geräte

3.1.1. Verbrauchsmaterialien

Blutagarplatten	Difco
Chirurgisches Nahtmaterial Vicryl 5.0	Ethicon
Cover Slips	Nunc
Cryomold	Sakura
Deckgläser	Menzel Gläser
EDTA-Röhrchen	Sarstedt
Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner
FACS-Röhrchen	BD Falcon
Insulinspritzen U-100	BD Falcon
Ketamin 10 % Injektionslösung	Belapharm
Kompressen	Hartmann
Mikrokapillaren	Sarstedt
Mikrotiterplatten (6-, 12-, 24-, 96-Wellplatten)	BD Falcon
Mikrovetten	Sarstedt
Objektträger	Marienfeld
Petrischalen	Greiner
PVDF-Membran 96-Wellplatte	Millipore
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt
Rompun 2 % Injektionslösung	Bayer Vital GmbH
Schieblehre	Aesculap
Spitzen (10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Greiner
Sterilfilter (0,2 µm)	BD Falcon
Wachsstift	Dako
Zellkulturflaschen (25 mm ² , 75 mm ²)	Greiner
Zellsiebe (70 µm, 100 µm)	BD Falcon
Zentrifugenröhrchen (14 ml, 15 ml, 50 ml)	Greiner

3.1.2. Chemikalien

Agar	Oxoid
Ammoniumchlorid	Roth
Aquatex	Merck
BCIP/NBT	KPL
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma
5-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)	Immunochemistry Technologies
Cell Wash	Becton Dickinson
Diethylether	J.T. Baker
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom AG
Eindeckmedium Aquatex	Merck
Ethanol (96 %, 70 %)	Zentralapotheke des Klinikums
FACS Flow	Becton Dickinson

Ficoll (1,077 g/ml)	Amersham
Formafix 4 %	Grimm med. Logistik GmbH
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA
Hefeextrakt	Oxoid
Mayer`s Hämalan	Merck
Methanol	LabScan
PBS	Zentralapotheke des Klinikums
Penicillin	Gibco/Invitrogen
Proculin Augentropfen	Ankerpharm
Propidiumjodid	Sigma
RNase	Sigma
Streptomycin	Gibco/Invitrogen
Todd Hewitt Broth (THB)	Oxoid
Tissue Tek	Sakura
Tris	Roth
Triton-X-100	Sigma
Trypanblau	Fluka
Trypsin-EDTA	Gibco/Invitrogen
Tween 20	Sigma

3.1.3. verwendete Kits

ABC Staining System	Santa Cruz
Multiplex Cytokine Assay	Biorad
Cytotox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega
ELISpot-IFN- γ Assay	Mabtech
Live/Dead Viability Cytotoxicity Kit	Molecular Probes
Mouse Regulatory T cell Staining Kit	eBiosciences
Total Cytotoxicity und Apoptosis Detection Kit	Immunocytochemistry Technologies

3.1.4. verwendete Antikörper

3.1.4.1. Isotypkontrollantikörper für die Durchflusszytometrie

Tab. 2: Isotypkontrollantikörper für die Durchflusszytometrie.

Spezies	Isotyp	Markierung	Hersteller
Ratte	IgG1	FITC	BD Pharmingen
Hamster	IgG	FITC	BD Pharmingen
Ratte	IgG2a	FITC	eBioscience
Ratte	IgG2b	FITC	BD Pharmingen
Ratte	IgG2a	PE	eBioscience
Ratte	IgG1	APC	eBioscience

3.1.4.2. spezifische Antikörper für die Durchflusszytometrie

Tab. 3: Antikörper für die Durchflusszytometrie.

Spezies	Spezifität	Klon	Isotyp	Markierung	Hersteller
Ratte	CD3	17A2	IgG2b	FITC	BD Pharmingen
Ratte	CD4	GK1.5	IgG2b	FITC	Miltenyi Biotec
Ratte	CD8a	53-6.7	IgG2a	FITC	Miltenyi Biotec
Ratte	CD11b	M1/70.15.11.5	IgG2b	FITC	Miltenyi Biotec
Hamster	CD11c	N418	IgG	FITC	Miltenyi Biotec
Ratte	CD19	1D3	IgG2a	FITC	BD Pharmingen
Ratte	CD25	7D4	IgM	FITC	BD Pharmingen
Ratte	CD40	3/23	IgG2a	FITC	BD Pharmingen
Hamster	CD54	3E2	IgG1	FITC	BD Pharmingen
Ratte	CD62L	MEL-14-H2.100	IgG2a	FITC	Miltenyi Biotec
Ratte	CD71	C2	IgG1	FITC	BD Pharmingen
Hamster	CD80	16-10A1	IgG1	FITC	BD Pharmingen
Ratte	CD86	GL1	IgG2a	FITC	BD Pharmingen
Ratte	Gr1	RB6-8C5	IgG2b	FITC	Miltenyi Biotec
Ratte	CD45R	RA3-6B2	IgG2a	PE	eBioscience
Maus	NK1.1	PK136	IgG1	APC	eBioscience

3.1.4.3. Antikörper für die Immunhistochemie

Tab. 4: Primäre Antikörper für die Immunhistochemie.

Spezies	Spezifität	Zelltyp	Klon	Verdünnung
Ziege	von-Willebrand-Faktor	Endothelzellen	polyklonal	1:50
Ratte	CD4	T-Helferzellen	GK1.5	1:50
Ratte	CD8β	zytotoxische T-Zellen	H35-17.2	1:100

3.1.5. Puffer und Lösungen

Erythrozytenlysepuffer

0,16 M NH_4Cl , 0,17 M Tris

Phosphat-gepufferte isotone NaCl-Lösung (PBS)

15 mM NaCl, 80 mM

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 2 mM

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH 7,4

THY-Medium

36,4 g/l THB, 5 g/l Hefeextrakt

3.1.6. Geräte

Bio-Plex 200 System

Biorad

CO_2 -Brutschrank

Nunc Cellstar

ELISA-Reader anthos htIII

Anthos

FACS Calibur

Becton Dickinson

Kryostat	Leica CM3000
Laminarbox	Nunc
Magnetrührer	Uni Equip
Mikroskope	Will Wilovert S
	Zeiss Axiophot
	Zeiss Axiolab Fluoreszenzmikroskop
Neubauer-Zählkammer	Brand
pH-Meter	Mettler Toledo
Photometer	Biorad Smart Spec 3000
Pipetten	Eppendorf
Schüttler	Stovall Life Science Inc.
Thermomixer	Eppendorf
Vortex	Eppendorf
Waagen	Sartorius analytic
	Soehnle
Wasserbad	Unitherm W6
Zentrifugen	Beckman Avanti 30
	Hereaus Megafuge 1.0R

3.1.7. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

Die verwendeten Bakterienstämme wurden in THY-Medium kultiviert. Die fertigen Medien wurden bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Für die Herstellung von Agarplatten wurden dem Medium vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar zugesetzt. Für die Selektion rekombinanter Streptokokken wurde das autoklavierte Medium nach Abkühlung auf ca. 60 °C mit sterilfiltrierter Antibiotikallösung supplementiert, welche aus Chloramphenicol und Erythromycin, jeweils in einer Konzentration von 2 µg/ml, bestand. Die Blutagarplatten mit 5 % Schafsblut wurden von einem konventionellen Hersteller bezogen. Die Kultivierung der Bakterien auf Agarplatten erfolgte nach dem Ausfrieren zunächst für 24 h im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂). Anschließend wurden die Agarplatten ca. zwei bis drei Wochen bei 4 °C gelagert und bei Bedarf einzelne Kolonien mit Hilfe einer Impföse entnommen. In Flüssigmedium erfolgte die Kultur der Bakterien über Nacht ebenfalls im Brutschrank.

3.1.8. Bakterienstämme und bakterielles Lysat

Für die Untersuchungen wurden die Serotypen M3wt, M6wt, M18wt und M49wt eingesetzt. Zusätzlich wurde die Deletionsmutante M49 Δ sagA (SLS⁻mu) in die Analysen einbezogen. Dieses Bakterium kann infolge einer Transposonmutagenese kein funktionelles SLS produzieren und besitzt daher eine deutlich geringere Virulenz als der Wildtyp M49. Die Herstellung des Lysates von *S. pyogenes* M49 erfolgte aus einer über Nacht Kultur. Nach Einstellung der optischen Dichte (1,0) erfolgte der Zellwandaufschluss durch Inkubation mit Bakteriophagenlysin C₁ (30 min, 37 °C; PlyC₁ = 10000 U/ml) (126). Die bakterielle Lyse wird durch Destruktion des Polyrrhamnose Rückgrates der Bakterien induziert.

3.1.9. Zelllinien und Kulturmedien

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Laminar Flow Hood mit ausschließlich sterilen Materialien vorgenommen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Gewebekulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Als Kultivierungsmedium wurde DMEM verwendet, welches mit Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 µg/ml) und 10 % FKS supplementiert war. Das verwendete FKS wurde zuvor bei 56 °C für 30 min wärmebehandelt um Komplementfaktoren zu inaktivieren.

3.1.9.1. Humane Zellen

Die verwendeten humanen Zelllinien Panc-1, BxPC-3 und Capan-2 haben ihren Ursprung in Zellen von duktalem Adenokarzinom. Sie wachsen in Kultur adhärent und bilden unterschiedlich gut differenzierte Adenokarzinome in Nacktmäusen. Die Zellen wurden ursprünglich von der ATCC (American Type Culture Collection, Wesel, Deutschland) bezogen und standen der Arbeitsgruppe bereits zur Verfügung.

3.1.9.2. Murine Zellen

Bei Panc02 handelt es sich um eine murine, adhärent wachsende Pankreaskarzinomzelllinie auf C57Bl/6 Hintergrund. Die Zellen wurden 1984 aus den Pankreata von Mäusen isoliert, die infolge einer 3-Methylcholanthrenbehandlung Pankreastumoren entwickelten (127). Die Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Arne Scholz (Charité, Berlin) zur Verfügung gestellt. Die CMT-93 Zellen stammen aus einem polyploiden Rektumkarzinom der C57BL/6J Maus. Die in Suspension wachsenden EL4 Zellen wurden aus einem Lymphom einer C57BL/6N Maus nach vorangegangener 9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthracenbehandlung isoliert. Beide Zelllinien wurden von der ATCC bezogen. Bei den MC3T3-E1 Zellen handelt es sich um aus den Calvaria eines C57Bl/6 Mausembryos/-feten stammende Fibroblasten, welche von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland) bezogen wurden. Die PBMC wurden aus dem Blut von C57Bl/6N Mäusen durch Dichtegradientenzentrifugation gewonnen (s. 3.4.3.1.).

3.1.10. Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an weiblichen C57Bl/6N Mäusen mit einem Körpergewicht von 20 g vorgenommen. Die Tiere entstammten einer Zucht (Charles River Wiga; Sulzfeld, Deutschland) und wurden vor Beginn der experimentellen Untersuchungen für mindestens vier bis fünf Tage in einem klimatisierten Raum der Zentralen Versuchstierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock (Tierschutzbeauftragter Hr. Dr. rer. nat. H. Stein) artgerecht nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes in Gruppen von

vier bis sechs Tieren in einem Laborkäfig bei zwölfstündigem Tag-/Nachtzyklus unter Bereitstellung von Wasser und Standardlaborfutter ad libitum gehalten.

3.2. Tierexperimentelle Methoden

3.2.1. Tiermodell

Pankreastumoren wurden durch subkutane (s. c.) Injektion von 1×10^6 Zellen der syngenischen Zelllinie Panc02 in die rechte Flanke induziert. Das experimentelle Modell zur Induktion eines Pankreastumors wurde bereits beschrieben (128-130). Die Zellen wurden vor Injektion in 50 μ l steriler PBS Lösung resuspendiert und anschließend unter kurzer Ethernarkose injiziert. Das Tumorstadium wurde daraufhin zweimal wöchentlich kontrolliert, indem die Tumoren mit Hilfe einer Schieblehre in senkrecht zueinander stehenden Durchmessern vermessen und anschließend das Tumorstadium wie folgt berechnet wurde (110):

$$V(\text{mm}^3) = a^2 * b * 0,52$$

a= Breite des Tumors

b= Länge des Tumors

Die Euthanasie der Tiere erfolgte, wenn die Tumoren ein Volumen von 2000 mm^3 überschritten.

3.2.2. Infektionsmodell

Mäuse, bei denen sich ein Tumor mit einem mittleren Volumen von ca. 60 mm^3 entwickelt hatte (nach ca. 10-14 Tagen), erhielten eine einmalige intratumorale (i. t.) Injektion *S. pyogenes* Serotyp M49wt bzw. *S. pyogenes* SLS μ (suspendiert in je 50 μ l PBS). Die Applikation des Lysates erfolgte zweimal in einem Abstand von 4 Tagen (Abb. 4). Tiere der Kontrollgruppe erhielten jeweils in äquivalenten Volumina die Trägerlösung i. t. injiziert. Diese war bei den vitalen Bakterien PBS und bei dem Lysat PBS + PlyC $_1$. Nach Desinfektion der Injektionsstelle erfolgte unter kurzer Ethernarkose die i. t. Applikation. Das Tumorstadium wurde nachfolgend zwei Mal wöchentlich bestimmt (s. 3.2.1.). Die Euthanasie der Tiere erfolgte, bevor klinisch manifeste funktionelle Störungen beobachtet wurden (Lethargie, Kachexie) bzw. das Volumen der Tumoren mehr als 2000 mm^3 betrug.

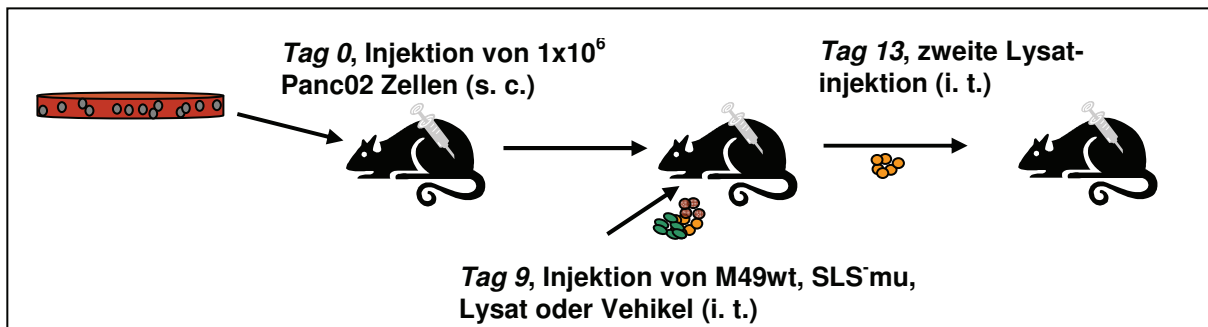


Abb. 4: Experimentelles Protokoll zur Induktion der Tumoren mit anschließender Therapie. Die Panc02 Zellen wurden am Tag 0 injiziert. Nach Etablierung der Tumoren erfolgte am Tag 9 die i. t. Injektion des M49wt, der SLS^{mu}, des Lysates bzw. der Vehikellösung. Am Tag 13 wurde das Lysat ein 2. Mal injiziert. Zu entsprechenden Zeitpunkten erfolgte die Euthanasie der Tiere mit nachfolgender Organentnahme.

3.2.3. Anästhesie, Organentnahme und Gewebeasservierung

Die Anästhesie der Tiere wurde mit einem Gemisch aus Ketamin/Xylazin (90/25 mg/kg KG) eingeleitet. Die Betäubung erfolgte intraperitoneal (i. p.). Anschließend wurden die Tiere gewogen und an Bauch und Flanke rasiert. Daraufhin folgte die Blutentnahme über den retrobulbären Venenplexus. Hierzu wurde eine 20 μ l Kalium-EDTA-beschichtete Mikrohämatokritkapillare unter leichten Drehbewegungen vorsichtig am Bulbus vorbei in okzipitaler Richtung etwa 1-2 mm tief eingeführt und so der Venenplexus punktiert. Das Blut wurde in einer Kalium-EDTA-beschichteten Küvette aufgefangen und leicht geschwenkt. Die Tiere wurden daraufhin durch eine Überdosis an Ketamin/Xylazin (90/25 mg/kg KG) getötet.

Anschließend wurde der Tumor reseziert, das Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -20 °C für nachfolgende Analysen (s. 3.5.) asserviert. Nach Desinfektion des Abdomens erfolgte dann die Eröffnung mit einem medianen Longitudinalschnitt (Abb. 5). Es folgte die Lungen-, Pankreas- und Leberresektion, die Extirpation der Milz, sowie der paraaortalen und mesenterialen Lymphknoten. Die Gewebe wurden bis zur Weiterverarbeitung in Medium, auf Eis aufbewahrt. Zusätzlich wurden Resektate der Organe für nachfolgende histologische Begutachtungen in 4 % Formalin fixiert.

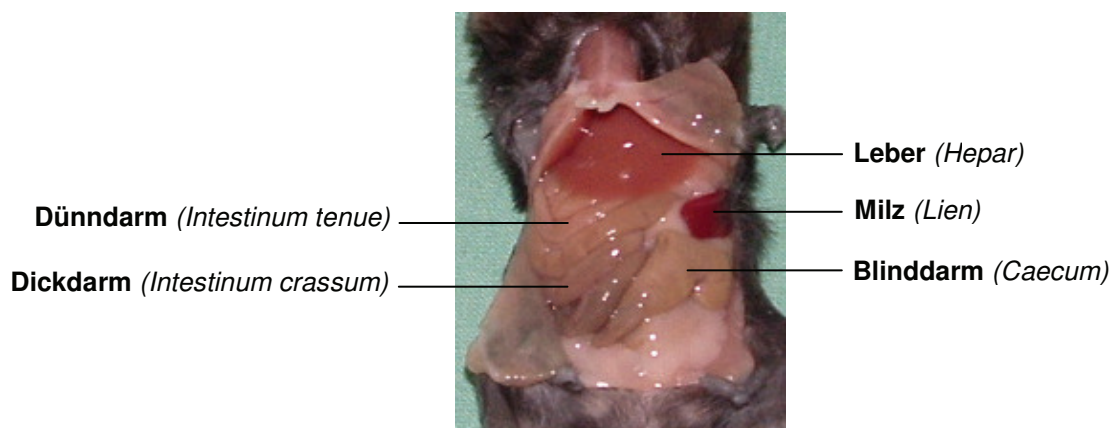


Abb. 5: Darstellung des Präparationssitus der Maus. Die inneren Organe sind unauffällig. Leber und Darm zeigen makroskopisch keine Veränderungen. Die Milz ist leicht vergrößert.

3.2.4. Rechallenge-Experimente

Für die Analyse der spezifischen zytotoxischen Aktivität von Lymphozyten gegenüber Panc02 Zellen *in vivo* wurden Rechallenge-Experimente durchgeführt. Hierzu wurden die zu transferierenden Zellen zunächst, wie nachfolgend unter Punkt 3.4.1. beschrieben, geerntet und auf eine tumorogene Dosis eingestellt. Anschließend wurden die Zellen s. c. in die kontralaterale Flanke injiziert und die Bildung sichtbarer Tumoren über einen Gesamtzeitraum von 28 Tagen analysiert. Dabei wurde das Tumolvolumen zweimal pro Woche kontrolliert (siehe 3.2.1.).

3.2.5. Vollblut- und Blutplasma-Analytik

3.2.5.1. *kleines Blutbild*

Die Erstellung des Blutbildes erfolgte aus 250 µl EDTA-komplexiertem Blut mit Hilfe eines Blutanalysegerätes. Die Messung erfolgte im Hämatologischen Zentrallabor der Klinik für Innere Medizin der Medizinischen Fakultät (Universität Rostock). Hierbei wurden die systemische Leukozyten- und Thrombozytenkonzentration sowie der systemische Hämatokrit bestimmt.

3.2.5.2. *Differentialblutbild*

Um die prozentuale Zusammensetzung der Leukozyten zu bestimmen, erfolgte die manuelle Blutbildanalyse an Blutausstrichen. Zur Anfertigung der Blutausstriche wurden 5 µl Vollblut auf einen entfetteten Objektträger gegeben, mit einem im 45° Winkel angelegtem Deckgläschen unter möglichst geringem mechanischen Druck auf den Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet.

Die panoptische Färbung nach Pappenheim erfolgte maschinell im Hämatologischen Zentrallabor der Klinik für Innere Medizin der Medizinischen Fakultät (Universität Rostock). Bei dieser Färbemethode werden die einzelnen Zellkompartimente mit sauren und basischen Farbstoffen angefärbt und zugleich fixiert (Methanol) sowie stabilisiert (Glycerin). Die Zellkerne erscheinen dunkelrot bis violett, Lymphozyten und Monozyten können neben Größe und Kern anhand ihrer Zytoplasmafärbung, Granulozyten anhand ihrer verschieden gefärbten Granula diskriminiert werden. Die nachfolgende mikroskopische Differenzierung der Leukozyten erfolgte im 63x Ölimmersionsobjektiv (Plan-NEOFLUAR, Zeiss, 1,4 NA). Dabei wurden pro Ausstrich 100 Zellen differenziert, wobei folgende Zellfraktionen unterschieden wurden: Lymphozyten, segment- und stabförmige neutrophile Granulozyten, eosinophile und basophile Granulozyten, sowie Monozyten.

3.2.5.3. Bestimmung von Enzymen im Blutplasma

Zur Untersuchung spezifischer Enzyme wurde Plasma aus Vollblut durch Zentrifugation ($1000 \times g$, 10 min, 20 °C) gewonnen und bei -20 °C asserviert. Anschließend wurden die Aktivitäten der Leberenzyme Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und Alanin-Aminotransferase (ALAT), sowie der Lactat-Dehydrogenase (LDH) in einem Serumanalysegerät im Hämatologischen Zentrallabor der Klinik für Innere Medizin der Medizinischen Fakultät (Universität Rostock) bestimmt.

3.2.5.4. Zytokinbestimmung im Blutplasma

Die Zytokin- und Chemokinkonzentrationen von IL-3, IL-5, IL-6, IL-10, G-CSF, GM-CSF, TNF- α und IFN- γ aus Blutplasma wurden mit dem Multiplex Cytokine Assay gemäß Herstellerangaben bestimmt. Diese Methode zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus, mit einer Detektionsgrenze von weniger als 0,5 pg/ml. Darüber hinaus erlaubt die Multiplex Analyse die simultane Messung mehrerer Zytokine und Chemokine. Das System basiert auf einer Kombination von ELISA und Durchflusszytometrie. Es werden 5,6 μm große Polystyren-Beads verwendet, die mit zwei Farbstoffen gefärbt sind und durch unterschiedliche Farbkonzentrationen unterschieden werden können. An den Beads sind die für das Zytokin oder Chemokin spezifischen Antikörper gekoppelt, die bei der Inkubation mit der Probe diese binden. Die Zugabe von einem Biotin-markierten sekundären Detektionsantikörper und Streptavidin-PE führt zu einer Signalverstärkung, die gemessen werden kann (Abb. 6).

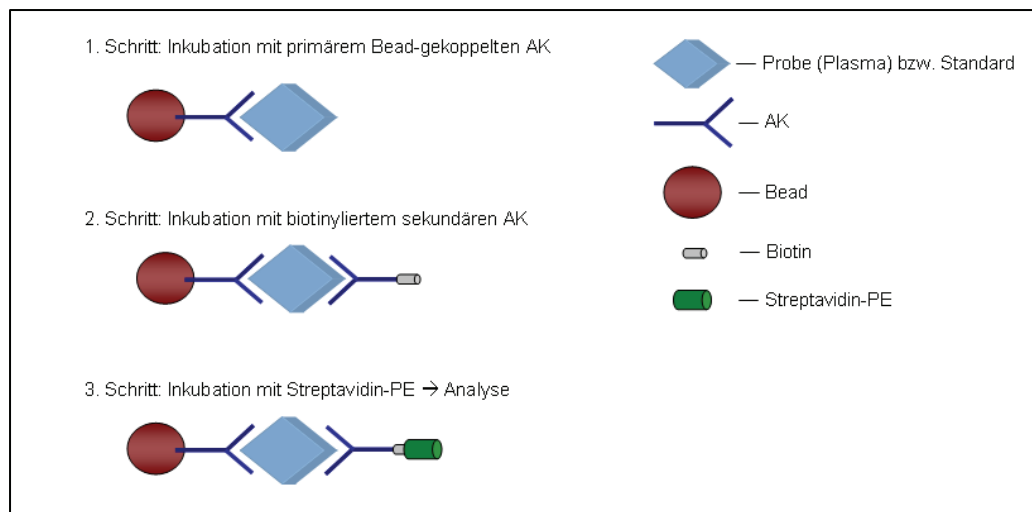


Abb. 6: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips des Multiplex Cytokine Assay. In einem ersten Schritt werden die Proben bzw. Standards mit einem Bead-gekoppelten primären Antikörper inkubiert, der spezifisch für das jeweilige Zytokin ist. Anschließend wird ein sekundärer biotinylierter Antikörper zugegeben, der an ein anderes Epitop auf der Probe/dem Standard bindet, als der primäre Antikörper. Nach Zugabe von Streptavidin-PE erfolgt die Messung am Bio-Plex Manager, wodurch die jeweilige Zytokinkonzentration ermittelt werden kann.

Für die Messung wurden die Proben 1:4 verdünnt und mit den Antikörper-gekoppelten Beads für 30 min in einer 96-Wellplatte inkubiert. Im Reagenziensystem enthaltene Standardkonzentrationen jedes Zytokins/Chemokins dienten der späteren Quantifizierung jedes Analyten über individuelle Standardkurven. Nicht gebundene Proteine wurden anschließend durch mehrere Waschschriffe entfernt. Anschließend wurde der sekundäre biotinylierte Antikörper zugegeben und die Proben ein weiteres Mal für 30 min inkubiert. Im Anschluss fand ein weiterer Waschschriff statt, nachdem Streptavidin-PE dem Versuchsansatz zugefügt und der Versuchsansatz erneut für 10 min inkubiert wurde. Im folgenden Waschschriff wurde das überschüssige Streptavidin entfernt und die Messung am Bio-Plex Manager durchgeführt. Anhand zweier Laser wurde zum einen die Integrität der Beads und deren Farbcodierung festgestellt, zum anderen wurde mit dem zweiten Laser Streptavidin-PE detektiert und dessen mittlere Fluoreszenz berechnet. Pro Messung wurden je 100 Beads ausgewertet. Für die quantitative Analyse wurde anschließend die Konzentration der einzelnen Zytokine relativ zu den unbehandelten Kontrolltieren (= eins) gesetzt und der x-fache relative Anstieg berechnet.

3.3. Mikrobiologische Methoden

Für die, im nachfolgenden beschriebenen Methoden (3.3.3., 3.3.4., 3.3.5.), wurden die Zelllinien Panc02, Panc-1, BxPC-3, sowie Capan-2 eingesetzt. Bei den Bakterien wurden die Wildtypstämme M3, M6, M18 und M49, sowie die Deletionsmutante SLS μ in die Analysen einbezogen.

3.3.1. Einstellung und Kontrolle des Inokulums

Für die Herstellung des Inokulums wurden die Bakterien aus einer über Nacht Kultur zunächst durch Zentrifugation pelletiert, einmal mit PBS gewaschen und in 1 ml THY-Medium resuspendiert. Anschließend wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Diese differierte je nach Versuchsansatz. Für die *in vitro* Arbeiten wurde eine OD_{600nm} von 0,5 eingesetzt, was ca. 10^6 - 10^7 cfu/ml entspricht. Bei der Infektion der Tiere mit vitalen Bakterien wurde die OD_{600nm} auf 0,05, 0,1 und 0,5 (ca. 10^5 - 10^7 cfu/ml) eingestellt. Bei dem Einsatz des Lysates betrug die Ausgangs-OD_{600nm} = 1,0.

Von diesen Konzentrationen wurden anschließend serielle Verdünnungen ausplattiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert, um die Zahl und die Reinheit der eingesetzten Bakterien zu überprüfen. Die Bestimmung der Bakterienzahl erfolgte durch Auszählen der CFU pro Agarplatte unter Einberechnung der Verdünnungsstufen.

3.3.2. Bakterientiterbestimmung in Blut, Leber und Lunge

Zum Nachweis bzw. Ausschluss eines potentiellen systemischen Infektionsverlaufes nach i. t. Infektion mit *S. pyogenes* wurden Leber- und Lungenhomogenate hergestellt. Hierzu

wurden die Organe durch einen sterilen Filter (Porengröße 70 µm) passiert und durch Zentrifugation (900 x g, 10 min, 4 °C) pelletiert. Das Homogenat wurde anschließend in 1 ml Medium resuspendiert. Parallel dazu wurde Blut für die Ausstriche bereitgestellt. Davon wurden Verdünnungsstufen in Medium bis 10^{-4} erstellt und je 100 µl der 10^0 - 10^{-4} Verdünnungen auf Blutagarplatten ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde die Bakterienzahl wie zuvor beschrieben bestimmt.

3.3.3. Adhärenz und Internalisierung

Für die Adhärenz- und Internalisierungsversuche wurden 4×10^5 Zellen/ml in Triplikaten in 24-Wellplatten ausgesät und bis zur Ausbildung eines semikonfluenten Monolayers im Brutschrank inkubiert. Die Bakterienteststämme wurden vor Versuchsbeginn in THY-Medium angeimpft und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die OD, wie bereits unter 3.3.1. beschrieben, auf 0,5 eingestellt und die Bakteriensuspension 1:10 mit Zellkulturmedium verdünnt. Nach Entfernung des Zellkulturmediums wurde die Bakteriensuspension zugesetzt und der Ansatz für 2 h im Brutschrank inkubiert. Zur Eliminierung aller nicht-adhärenen Bakterien wurde das Medium verworfen, die Wells mit PBS gewaschen und ein Teil der Zellen nachfolgend durch Zugabe von 200 µl Trypsin/EDTA abgelöst. Daraufhin wurden die Zellen pelletiert und in 1 ml A. dest lysiert. Zur Bestimmung der Anzahl adhären-ter Bakterien wurden Verdünnungsstufen in THY-Medium bis 10^{-7} erstellt und je 100 µl der 10^{-3} - 10^{-7} Verdünnungen auf THY-Agarplatten ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht im Brutschrank inkubiert. Unter diesen Versuchsbedingungen konnten sowohl die adhären-ten, als auch die internalisierten Bakterien erfasst werden. Für die Internalisierungsversuche wurde nach der zweistündigen Inkubation frisches Medium zu den Zellen gegeben, welches zuvor mit Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) versetzt wurde. Die Zellen wurden nun für weitere 2 h im Brutschrank inkubiert. Dadurch wurden alle extrazellulären Bakterien abgetötet, so dass nur die internalisierten Bakterien überleben. Zur weiteren Analyse des Anteils an intrazellulären Bakterien erfolgte die Durchführung wie zuvor beim Adhärenztest beschrieben.

Die nachfolgende Auswertung des Anteils an adhären-ten und internalisierten Bakterien erfolgte durch Auszählen der CFU pro Agarplatte unter Einberechnung der Verdünnungsstufen. Zur Berechnung des Invasionsindex wurde die Anzahl der invasiven Keime in Relation zur Anzahl der adhären-ten Keime gesetzt. Insgesamt wurde der Mittelwert aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ermittelt.

3.3.4. Live/Dead Cytotoxicity Viability Assay

Die Analyse des toxischen Potentials verschiedener Bakterienstämme gegenüber den Zellen erfolgte anhand des Live/Dead Viability Cytotoxicity Assay. Mit Hilfe dieses Tests können

tote und vitale Zellen nach Anfärbung mit den Farbstoffen Ethidiumbromid bzw. Calcein AM differenziert werden. Calcein AM (Acetoxymethylester) ist ein nicht-fluoreszierender Farbstoff, der passiv in die Zellmembran eindringt. Nach unspezifischer Esterspaltung entsteht dann in der Zelle das stark fluoreszierende Calcein, welches dem Nachweis der Zellviabilität dient. Der Avitalfarbstoff Ethidiumbromid hingegen kann nur bei Verlust der intakten Zellmembran in die Zelle eindringen. Eine Ethidiumbromid-positive Färbung ist somit ein direkter Hinweis auf Zellschädigung.

Hierzu wurden die Zellen zunächst auf Deckgläschen (Cover slips) in 6-Wellplatten ausgesät und bis zur Ausbildung eines konfluenten Monolayers inkubiert. Die Bakterienteststämme wurden vor Versuchsbeginn in THY-Medium angeimpft und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die OD, wie bereits unter 3.3.1. beschrieben, auf 0,5 eingestellt und die Bakteriensuspension 1:10 mit Zellkulturmedium verdünnt. Nach Entfernung des Zellkulturmediums wurde die Bakteriensuspension zugesetzt und der Ansatz für 2 h im Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel, um eine zu starke bakterielle Vermehrung auszuschließen. Anschließend wurden die Zellen erneut für 2 h bzw. 4 h im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurde zunächst das Medium verworfen und die Zellen zweimal mit PBS gespült. Daraufhin wurde die Färbelösung, bestehend aus dem Avitalfarbstoff Ethidiumbromid und dem Vitalfarbstoff Calcein AM (3,5:1) zu den Zellen pipettiert und für 40 min im Dunkeln inkubiert, bevor die mikroskopische Analyse erfolgte. Tote Zellen stellen sich dabei infolge der Anfärbung mit Ethidiumbromid (Grünfilter: Excitation/Emission 528/617 nm) rot dar und vitale Zellen grün (Blaufilter: Excitation/Emission 492/517 nm). Pro Präparat wurden dabei vier bis fünf Gesichtsfelder erfasst und nachfolgend off-line ausgewertet.

3.3.5. Bestimmung extrazellulärer LDH im Zellkulturüberstand

Die LDH ist ein stabiles zytoplasmatisches Enzym, welches in allen eukaryotischen Zellen vorhanden ist. Bei Zellmembranschäden tritt es aus dem Zytosol aus und ist im Überstand des Zellkulturmediums zu messen (131).

Dieser wurde im Rahmen der Infektionsversuche zu den Zeitpunkten 4 h und 6 h gewonnen und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Anschließend wurden jeweils 100 µl Zellkulturüberstand in Duplikaten in eine 96-Wellplatte pipettiert. Dazu wurden jeweils 100 µl des Reaktionsgemisches gegeben und für 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, so dass es mittels der sich im Zellkulturüberstand anreichernden LDH zum Farbumschlag kommt. Als Positivkontrolle diente 0,1 % Triton-X-100. Dieses Detergenz führt zu einer Zellmembranlyse mit starker LDH-Freisetzung. Die Zytotoxizität der Bakterien wurde daraufhin photometrisch bei 492 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) gemessen.

3.4. Zellbiologische Methoden

3.4.1. Kultivierung, Passagieren, Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Kultivierung und Passagieren von Zellen

Alle Zelllinien (human, murin) wurden in Medium bei 37 °C, 5 % CO₂ kultiviert. Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte zweimal pro Woche. Zur Passagierung der adhärenenten Zellen wurde das Kulturmedium verworfen und die Flasche einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von Trypsin geerntet, nach Zentrifugation (5 min, 500 x g, 20 °C) in 1 ml Medium suspendiert, entsprechend auf die Kulturflaschen verteilt und mit Medium aufgefüllt. Zellen in Suspension wurden zusammen mit dem Kulturmedium in ein Röhrchen überführt und durch Zentrifugation (5 min, 500 x g, 20 °C) pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend ebenfalls in Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

Kryokonservierung von Zellen

Zur Konservierung der Zellen, wurden diese nach dem Abtrypsinieren und Zentrifugieren (5 min, 500 x g, 20 °C) in Einfriermedium (FKS + 15 % DMSO, steril) resuspendiert und in ein Einfrier Röhrchen überführt. In Einfrierboxen wurden die Zellen zunächst für zwei Tage bei -80 °C eingefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Die tiefgefrorenen Kulturen sind so mehrere Jahre haltbar.

Auftauen von Zellen

Um kryokonservierte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden in ein 15 ml Röhrchen Medium vorgelegt und die Zellen schnell bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden in das Röhrchen überführt und anschließend durch Zentrifugation (5 min, 500 x g, 20 °C) pelletiert. Das Zellpellet wurde in Kulturmedium resuspendiert und in Kulturflaschen überführt.

3.4.2. Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde je ein Aliquot der entsprechenden Zellsuspension 1:10 mit PBS und Trypanblau verdünnt. Trypanblau färbt ausschließlich Zellen an, deren Membranintegrität verloren ist, da es intrazellulär an Proteine bindet. Vitale Zellen sind hingegen in der Lage, den Farbstoff auszuschließen und können somit gut von toten Zellen differenziert werden.

Eine Neubauer-Zählkammer wurde mit 10 µl der Verdünnung befüllt, anschließend wurden die vier Großquadrate des Zählgitters ausgezählt. Die entsprechende Zellzahl ergibt sich aus folgender Formel:

$$\text{Zellen / ml} = \text{gezählte Zellzahl} / 4 * \text{Verdünnungsfaktor}(10) * \text{Zählkammerfaktor}(10^4)$$

3.4.3. Isolierung von Effektorzellen der Immunantwort

3.4.3.1. Isolierung von PBMC aus Vollblut

Um PBMCs aus Vollblut zu isolieren, wurden 500 µl Vollblut 1:2 mit Medium verdünnt und anschließend über 5 ml Ficoll (Dichte: 1,077 g/ml) überschichtet. Durch Zentrifugation (1200 x g, 20 min, 20 °C, ohne Bremse) erfolgt eine Separation entsprechend der Dichte der einzelnen Zellkompartimente. Die nun im Phasenübergang zwischen Medium und Ficoll angereicherten (B- und T-) Lymphozyten sowie Monozyten konnten daraufhin vorsichtig mit einer Pipette abgezogen werden, während aggregierte Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen mit dem Pellet verworfen wurden. Die gereinigte und angereicherte Lymphozytensuspension wurde daraufhin zweimal mit Medium gewaschen, bevor die Zellzahl mit Hilfe der Trypanblaufärbung bestimmt wurde (s. 3.4.2.).

3.4.3.2. Isolierung von Leukozyten aus Milzgewebe

Das Milzgewebe wurde zunächst durch ein steriles Zellstrainersieb (70 µm Porengröße) gefiltert. Nach gründlichem Nachspülen wurde das Homogenat anschließend durch Zentrifugation (900 x g, 10 min, 4 °C) pelletiert. Nach einmaligem Waschen in sterilem Medium erfolgte dann die Lyse der Erythrozyten mit Lysepuffer für 10 min bei RT auf einem Schüttler. Nach Zusatz von 5 ml Medium und erneuter Zentrifugation (900 x g, 5 min, 4 °C) folgte ein weiterer Waschschriff mit Medium. Daraufhin wurde das Zellpellet vorsichtig in 3 ml Medium resuspendiert und die Zellzahl mittels Trypanblaufärbung bestimmt (s. 3.4.2.). Wurden die Lymphozyten nachfolgend im ELISpot eingesetzt (s. 3.4.5.1.), wurde zusätzlich eine Dichtegradientenzentrifugation vorgenommen, wie unter 3.4.3.1. beschrieben.

3.4.3.3. Isolierung von Lymphozyten aus Lymphknoten

Die paraaortalen und mesenterialen Lymphknoten wurden durch einen sterilen Filter (100 µm Porengröße) passiert und durch Zentrifugation (900 x g, 10 min, 4 °C) pelletiert. Nach wiederholtem Waschen und vorsichtiger Resuspension wurde die Zellzahl durch Trypanblaufärbung ermittelt (s. 3.4.2.).

3.4.4. Durchflusszytometrie

3.4.4.1. Funktionsprinzip

Die Durchflusszytometrie (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting) bietet die Möglichkeit, Zellen anhand ihres Phänotyps zu unterscheiden und zu quantifizieren. Dabei werden die zu untersuchenden Zellen als Einzelzellsuspensionen mit fluoreszierenden Antikörpern markiert und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom einzeln hintereinander, mit Hilfe eines fokussierten Laserstrahls, analysiert.

Zelleigenschaften wie Größe, Form, Membranoberfläche und intrazelluläre granuläre Bestandteile führen zu einer Lichtstreuung, die von je einer Linse in Verlaufsrichtung des La-

serstrahls (Vorwärtsstreulicht, *forward scatter*, FSC) und einer rechtwinklig dazu angebrachten (Seitwärtsstreulicht, *sideward scatter*, SSC) gesammelt und photometrisch detektiert wird. Das FSC gibt dabei Aufschluss über die Größe der Partikel, das SSC zeigt die intrazelluläre Granularität an. Die gewünschte Zellpopulation wird anhand dieser Kriterien so ausgewählt, dass sie einerseits deutlich abgrenzbar ist und andererseits tote Zellen und Zellfragmente, welche deutlich geringere FSC-Werte aufweisen, mit Hilfe eines bestimmten Aufnahme Fensters ausgeschlossen werden können. Der Laserstrahl regt das jeweilige Chromophor zur Emission von Lichtquanten an, die durch eine Linse gesammelt werden. Filter trennen das gesammelte Licht nach Wellenlängenbereichen und lenken es zu den unterschiedlichen Detektoren. So können Signale mehrerer verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe bei einer Mehrfarbanalyse getrennt aufgenommen und quantitativ analysiert werden. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz ist dabei proportional zur Anzahl der pro Zelle gebundenen Antikörper und damit zur Anzahl der markierten Oberflächenmoleküle.

Das in dieser Arbeit verwendete Durchflusszytometer *FACS Calibur* ist mit einem Argonion-Laser ausgestattet, der monochromatisches Licht der Wellenlänge 488 nm mit einer Leistung von 15 mW emittiert.

3.4.4.2. Apoptosenachweis mittels Sub-G1-Peak

Apoptotische Zellen wurden im Rahmen der Untersuchungen mit Hilfe der Sub-G1-Peak-Methode analysiert. Intakte Zellen enthalten keine DNA im Zytoplasma. DNA in apoptotischen Zellen unterliegt einer Fragmentation durch Endonukleasen in Oligonukleosomen. Diese beginnen in das Zytoplasma zu migrieren, so dass der zelluläre Gehalt an nukleärer DNA abnimmt, während der Gehalt an kleineren DNA-Bruchstücken im Nukleus und im Zytoplasma zunimmt. Die Fragmentation der DNA erfolgt dabei charakteristisch in Abständen von n (146 ± 50) bp. Durchflusszytometrisch kann der DNA-Gehalt nach Färbung mit Propidiumjodid gemessen werden. Apoptotische Zellen erscheinen dabei aufgrund des verminderten DNA-Gehaltes im sogenannten Sub-G1-Peak.

Hierfür wurden die Zellen (Panc-1, BxPC-3, Capan-2, Panc02) zunächst in 24-Wellplatten ausgesät und im Brutschrank bis zur Ausbildung eines konfluenten Monolayers inkubiert. Parallel wurden die entsprechenden Bakterienstämme in flüssigem THY-Medium angeimpft und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde die OD, wie bereits unter 3.3.1. beschrieben, auf 0,5 eingestellt und die Bakteriensuspension 1:10 mit Zellkulturmedium verdünnt. Nach Entfernung des Zellkulturmediums wurde die Bakteriensuspension zugesetzt und der Ansatz für 4 h bzw. 6 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 200 μ l Trypsin/EDTA gelöst und in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert. Nach Zentrifugation (5 min, 500 \times g, 20 °C) wurde der Überstand dekantiert und das Pellet unter permanentem vortexen in 1 ml eiskaltem Ethanol (70 %) resuspendiert. Diese Suspension wurde dann in ein FACS-Röhrchen unter weiterer Zugabe von 1 ml Ethanol

überführt und über Nacht bei -20 °C gelagert. Die fragmentierte DNA kann so aufgrund der Permeabilisierung der Zellmembran aus den Zellen austreten, gleichzeitig kommt es zur Auflockerung des Chromatins. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert (5 min, 500 x g, 4 °C) und einmal mit PBS gewaschen. Die Proben wurde nun mit 400 µl PBS/0,1 % Tween 20, RNase 1 mg/ml versetzt und mindestens 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 µg Propidiumjodid zu dem Gemisch pipettiert und die Proben am Durchflusszytometer gemessen. Dort zeichnen sich apoptotische Zellen durch eine, auf einem verminderten DNA-Gehalt beruhende, reduzierte Rotfluoreszenz aus. Pro Messung wurden 10.000 Ereignisse erfasst.

3.4.4.3. Analyse von Oberflächenantigenen in Blutleukozyten

Für die durchflusszytometrischen Analysen wurde das Vollblut 1:2 mit Cell Wash verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden anschließend 50 µl Aliquots in FACS-Röhrchen überführt und mit dem entsprechenden FITC-markierten Antikörper für 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Erythrozytenlyse erfolgte nach Zugabe von 1 ml Lysepuffer (FACS Lysing Solution, 1:10) und Inkubation für 10 min unter Lichtausschluss. Nachfolgend wurden die Proben pelletiert (900 x g, 10 min, 20 °C), gewaschen, abschließend in Cell Wash resuspendiert und am Durchflusszytometer gemessen. Als Kontrollfärbung diente bei jeder Messreihe ein mit Fluoreszenzfarbstoff markierter isotypgleicher Antikörper. Pro Messung wurden 20.000 Ereignisse erfasst.

3.4.4.4. Nachweis von Foxp3 in regulatorischen T-Zellen

Der Quantifizierung von T_{reg} im Blut erfolgte anhand einer Oberflächenfärbung von CD4 und CD25, sowie einer intrazellulären Färbung, welche dem Nachweis von Foxp3 dient. Der Transkriptionsfaktor Foxp3 stellt dabei einen spezifischen und funktionellen Marker für diese Zellpopulation dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden T_{reg} im Blut anhand eines kommerziellen Kits gemäß Herstellerangaben bestimmt. Hierfür erfolgte zunächst die Oberflächenfärbung der PBMC (siehe 3.4.3.1.) mit FITC- bzw. APC-markierten Antikörpern gegen CD4 und CD25 in der optimalen Verdünnung (30 min, 4 °C). Nach Permeabilisierung der Membran (Fixierungs/Permeabilisierungslösung) und zweimaligem Waschen mit einmal Permeabilisierungspuffer (900 x g, 10 min, 20 °C) erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Hilfe des anti-CD16/CD32 Antikörpers für 15 min bei 4 °C, gefolgt von der intrazellulären Färbung mit PE-markiertem Antikörper gegen Foxp3 für 30 min bei 4 °C. Bei der anschließenden durchflusszytometrischen Analyse der Zellen wurden 100.000 Ereignisse erfasst.

3.4.4.5. Analyse von Oberflächenantigenen in Splenozyten

Die Charakterisierung von Splenozytensubpopulationen erfolgte aus 2×10^5 Zellen, welche in 100 µl Cell Wash resuspendiert und daraufhin mit FITC-, PE oder APC-markierten Antikörpern in der optimalen Verdünnung des jeweiligen Antikörpers für 20 min bei 4 °C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Proben einmal mit PBS gewaschen (900 x g, 10 min, 20 °C) und in 200 µl PBS resuspendiert. Als Kontrollfärbung diente bei jeder Messreihe ein mit Fluoreszenzfarbstoff markierter isotypgleicher Antikörper. Bei der Einfarbenmessung (Analyse von Oberflächenantigenen) wurden jeweils 20.000 Ereignisse erfasst. Bei der Mehrfarbenmessung (Nachweis von IKDC) wurden 100.000 Ereignisse erfasst.

3.4.5. Untersuchung der Reaktivität von Lymphozyten gegenüber Zielzellen

3.4.5.1. ELISpot-IFN- γ Assay

Der ELISpot (*Enzyme-linked Immunospot*) ist ein sehr sensibler Assay, welcher die Detektion von sezernierten Zytokinen auf Einzelzellebene erlaubt. Dabei korreliert die Größe und Intensität der einzelnen messbaren Spots mit dem Anteil an sezerniertem IFN- γ pro Zelle. Durch die Detektion von IFN- γ , welches T-Zellen (Effektorzellen) nach Aktivierung durch ein Antigen (Zielzellen) produzieren, dient der ELISpot der Analyse antigenspezifischer Immunantworten von T-Zellen.

Hierzu wurde eine Mikrotiterplatte, deren Wells mit Nitrozellulose beschichtet sind, mit einer 35 %igen Ethanollösung benetzt und max. für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen der Platte mit sterilem A. dest wurde die Antikörperlösung zugesetzt (15 µg/ml) und über Nacht bei 4 °C zur Absorption an die Matrix der Mikrotiterplatte inkubiert. Nachfolgend wurde die Antikörperlösung verworfen, die Platte mit PBS gewaschen und 2 h bei Raumtemperatur mit Medium zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Danach wurden die Zielzellen (Panc02, EL4, CMT-93, MC3T3-E1, PBMC) in einer Konzentration von 1×10^4 Zellen/Well in Triplikaten pipettiert und für ca. 2-3 h im Brutschrank inkubiert. Die Effektorzellen (Splenozyten) wurden nachfolgend in einem Effektor zu Target Verhältnis von 10:1 zu den jeweiligen Zellen gegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Daran schloss sich ein fünfmaliges Waschen der Platte mit PBS an, um die Zellen vollständig zu eliminieren. In einem weiteren Schritt erfolgte nun die Inkubation mit dem sekundären biotinylierten Detektionsantikörper (1 µg/ml) für 2 h bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde dann das Enzym Streptavidin-ALP zu den Wells gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Visualisierung der Spots erfolgte abschließend durch Zugabe des Komplexbildners BCIP/NBT für ca. 20-40 min. Die Reaktion wurde dann durch Abspülen in Leitungswasser abgestoppt, bevor die Platte bis zur mikroskopischen Auswertung getrocknet wurde.

3.4.6. Analyse der lytischen Aktivität von Lymphozyten gegenüber Zielzellen

3.4.6.1. LDH-Zytotoxizitätsassay

Zur Bestimmung der Reaktivität von Lymphozyten gegenüber Zielzellen wurde die Lyse von Panc02, EL4, CMT-93, MC3T3-E1, sowie PBMCs mit Hilfe des nicht-radioaktiven LDH-Zytotoxizitätstest bestimmt. Das zytosolische Enzym LDH, welches in allen eukaryotischen Zellen konstitutiv exprimiert wird, reichert sich im Zellkulturüberstand an, wenn eine Zelle irreversibel geschädigt wird. Eine erhöhte LDH-Aktivität im Überstand korreliert somit direkt mit dem Ausmaß der Zellschädigung.

Zur Durchführung des LDH-Assays wurden die Zielzellen mit einer Dichte von $1,5 \times 10^3$ Zellen/Well in Triplikaten in 96-Wellplatten ausplattiert und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Lymphozyten der paraaortalen und mesenterialen Lymphknoten zu den Zellen in einem Effektor zu Target Verhältnis von 30:1 pipettiert und über Nacht kokubiert. Nach Zentrifugation der Platte ($250 \times g$, 5 min, 20°C) wurde der zellfreie Kulturüberstand in eine neue 96-Wellplatte überführt, mit dem im Kit enthaltenen Assay Buffer-Substrat Mix versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Parallel wurden für jede Zielzellart die Maximalfreisetzung (Lyse mit 0,5 % Triton X-100) und die Spontanfreisetzung (Zielzellen ohne Effektorzellen) ermittelt. Die photometrische Auswertung, bei der der Umsatz an Tetrazoliumsalz in ein rotes Formazanprodukt gemessen wird, erfolgte nach Zusatz der Stopplösung bei einer Wellenlänge von 492 nm. Die Ergebnisse wurden als relative spezifische Lyse angegeben. Diese wurde aus den einzelnen Freisetzungswerten wie folgt berechnet:

$$\% \text{Lyse} = \frac{OD_{Exp} - OD_{Eff.sp.} - OD_{Z.sp.}}{OD_{Z.max.} - OD_{Z.sp.}} * 100$$

OD_{Exp} = Absorption der Kokultur (Zielzellen + Effektorzellen)

$OD_{Eff.sp.}$ = Absorption der Effektorzellen

$OD_{Z.sp.}$ = Absorption der Zielzellen

$OD_{Z.max.}$ = maximale Absorption der Zielzellen

3.4.6.2. Zytotoxizitäts-/Apoptosemessung

Das zytolytische Potential von Lymphozyten gegenüber Tumorzellen wurde zusätzlich durchflusszytometrisch anhand eines Zytotoxizitätstests bestimmt. Dieser Test dient der Differenzierung von Zytolyse und Apoptose. Für diese detaillierte Analyse wurden ausschließlich Panc02 Zellen als Zielzellen eingesetzt, um das lytische Potential von Lymphozyten gegenüber den Pankreastumorzellen genauer zu charakterisieren. Das Prinzip der Methode beruht auf einer Färbung mit drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen, welche eine Separierung zwischen Zielzellen und Effektorzellen erlauben. In einem ersten Schritt werden hierbei die Zielzellen mit CFSE markiert. Dieser Farbstoff dringt passiv in das Zellinnere ein und bindet

dort irreversibel an Zellproteine. Nach Hydrolyse des Esters durch intrazelluläre Esterasen kann die Fluoreszenz (Blaufilter: Excitation/Emission 492/520-540 nm) gemessen werden. Die Effektorzellen werden erst nach dieser Färbung zugesetzt, wodurch eine Unterscheidung der beiden Zellpopulationen möglich ist. Apoptotische Zielzellen können ferner durch Markierung mit SR-FLICA (Sulforhodamine-Fluorescent-labeled Inhibitor of Caspases) detektiert werden. SR-FLICA ist ein orange-rot fluoreszierender (Grünfilter: Excitation/Emission 565/590-600 nm) Poly-Caspase Inhibitor, welcher kovalent an aktive Caspasen bindet. Der Farbstoff ist zellpermeabel und nicht zytotoxisch. Tote bzw. nekrotische Zellen werden durch Färbung mit 7-AAD (7-Aminoactinomycin) identifiziert. Dieser rot-fluoreszierende Avitalfarbstoff (Grünfilter: Excitation/Emission 546/647 nm) interkaliert spezifisch zwischen Cytosin und Guanin und färbt dabei nur die DNA von Zellen an, die keine intakte Membran besitzen. Somit können sowohl spätapoptotische, als auch nekrotische Zellen detektiert werden.

In einem ersten Arbeitsschritt wurden dabei 1×10^7 Panc02 Zellen mit Assay Buffer gewaschen und mit CFSE in einer Endkonzentration von 2,5 μM für 15 min bei Raumtemperatur gefärbt. Nachfolgend wurden die Zellen pelletiert, in Medium resuspendiert und für weitere 30 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden zu 2×10^4 Zielzellen/100 μl die Effektorzellen in einem Effektor zu Target Verhältnis von 30:1 zugesetzt und für 4 h im Brutschrank inkubiert. Zur Darstellung apoptotischer Zellen wurden danach der Farbstoff SR-FLICA zugegeben (Konzentration 20x, 10 μl pro Ansatz). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 μl DMEM und Überführung der Proben auf Eis abgestoppt. Die Färbung nekrotischer Panc02 Zellen erfolgte dann durch Zugabe von 20 μl 7-AAD (21x) und nachfolgender Inkubation für 10 min auf Eis. Nachdem alle Einstellungen anhand der jeweiligen Kontrollen vorgenommen wurden, wurden die Proben zügig am Durchflusszytometer gemessen. Die Zielzellen wurden dabei anhand eines um die CFSE-positive Zellpopulation gesetzten elektronischen „Gates“ selektiv analysiert, wodurch eine Interferenz mit apoptotischen bzw. nekrotischen Effektorzellen ausgeschlossen werden konnte, um jeweils den Anteil frühapoptotischer, spätapoptotischer und nekrotischer Panc02 Zellen zu quantifizieren.

3.4.6.3. Analyse der lytischen Aktivität mittels Propidiumjodidfärbung

In einem weiteren Versuchsansatz wurden 3×10^4 CFSE-gefärbte Panc02 Zellen (s. 3.4.6.2.) mit Lymphknoten-Lymphozyten in einem Effektor zu Target Verhältnis von 30:1 für 20 h ko-kultiviert. Nach Zellernte wurde Propidiumjodid in einer Konzentration von 2,5 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt, der Anteil CFSE/Propidiumjodid-doppelt-positiver Zielzellen durchflusszytometrisch erfasst und die lytische Aktivität bestimmt. Zur Beurteilung der Spontanlyse wurden zusätzlich Panc02 Zellen, die ohne Effektorzellen kultiviert wurden, analysiert.

3.5. Histologische Methoden

3.5.1. Histomorphologie

Die histologischen Untersuchungen wurden an Gefrierschnitten durchgeführt. Hierzu wurde das Tumorgewebe direkt nach der Entnahme in dem Eindeckmedium Tissue Tek eingebettet und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Das Gewebe wurde daraufhin bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C asserviert. Nachfolgend wurden bei -20 °C am Kryostat 6 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Adhäsionsobjektträger gebracht und für ca. 1 h luftgetrocknet. Anschließend wurden die Schnitte entweder direkt gefärbt oder zunächst bei -80 °C gelagert.

Die HE- und As-D - Färbungen wurden im histologischen Labor des Instituts für Pathologie der Universität Rostock angefertigt.

3.5.1.1. HE-Färbung

Die HE-Färbung ist eine konventionelle Übersichtsfärbung zur Darstellung von Geweben. Unter der Verwendung der Farbstoffe Eisenhämatoxylin (Mayer`s Häkalaun) und Eosin G werden spezifisch Zellkompartimente angefärbt. Die Zellkerne erscheinen dunkelrot bis violett, das Zytoplasma und proteinhaltige Lösungen rosa.

Zu Beginn der Färbung wurden die Semi-Dünnschnitt-Präparate kurz in Formalin (4 %) fixiert und dann in Aqua dest. überführt. Für die Darstellung saurer Moleküle wurde das Gewebe anschließend für 30 s in Häkalaun gefärbt. Daran schlossen sich ein zehnminütiges Bläuen in warmem Leitungswasser und eine zweiminütige Färbung in Eosin (0,5 %) an. Überschüssiges Eosin wurde durch Abspülen in A. dest eliminiert. Daraufhin wurden die Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt (70 %, 96 %, absoluter Alkohol). Zum Ende der Färbung wurde die Tumorgewebsschnitte in Xylol inkubiert und abschließend in Pertex eingedeckt.

3.5.1.2. As-D Färbung

Für den Nachweis infiltrierender neutrophiler Granulozyten und deren Vorläuferzellen wurden die Semi-Dünnschnitt-Präparate des Pankreastumors mit Naphthol As-D Chlorazetatesterase (As-D) gefärbt. Die Esteraseaktivität in infiltrierenden Zellen wurde dabei durch die Interkalation des Farbstoffes Naphthol As-D Chlorazetat in die Granula sichtbar gemacht. Neutrophile Granulozyten sowie deren Vorstufen zeigen ebenso wie Gewebsmastzellen eine leuchtend rote Farbreaktion, während Monozyten schütter verteilt kleine positiv reagierende Granula enthalten.

Die Schnitte wurden hierfür für 30 s in einem Gemisch aus Methanol/Formaldehyd (37 %), Verhältnis 1:2, fixiert und nachfolgend leicht gewässert. In einer einstündigen Inkubation mit der angefertigten Reagenzlösung erfolgte die Färbung der Schnitte. Nach erneutem Wäs-

sen unter fließendem Wasser wurde die Kernfärbung mit Hämalaun durchgeführt. Daran schloss sich ein fünf- bis zehnminütiges Bläuen in warmem Leitungswasser an, bevor die Schnitte abschließend mit Glyceringelatine eindeckt wurden. Die Auswertung der As-D gefärbten Semi-Dünnschnitt-Präparationen erfolgte mit Hilfe eines Okularnetzgitters unter dem Auflichtmikroskop (Axiophot, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) unter Verwendung eines 40x Objektives (Plan-NEOFLUAR, Zeiss, 0,75 NA). In allen As-D gefärbten Schnitten wurde die Anzahl infiltrierender neutrophiler Granulozyten durch Auszählen von 20 Gesichtsfeldern (GF) ermittelt und anschließend pro mm² berechnet (1 GF = 0,09 mm²).

3.5.2. Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Untersuchungen erfolgten ebenfalls als Semi-Dünnschnitt-Präparationen an 6 µm dicken Gefrierschnitten. Hierbei kam die ABC (Avidin-Biotin-Komplex) Methode zum Einsatz. Grundlage dieses Systems ist die Fähigkeit des Glykoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin zu binden, wodurch der Avidin-Biotin-Komplex entsteht. Bei der Entwicklungsreaktion dient die Peroxidase als Substrat und das 3,3 Diaminobenzidin (DAB) als Chromogen. Das entstehende braungefärbte Endprodukt ermöglicht den Nachweis positiver Zellen unter dem Lichtmikroskop.

Vor Beginn aller immunhistochemischen Analysen wurden die Schnitte zunächst für 30 s in eiskaltem Methanol fixiert, in PBS gespült und luftgetrocknet. Anschließend erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen in dem entsprechenden Serum für 1 h. Die Präparate wurden dann mit dem primären Antikörper für 90 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Nachdem die Schnitte dreimal mit PBS gespült wurden, erfolgte die Zugabe des sekundären biotinylierten HRP-konjugierten Antikörpers (1:67, ca. 1 µg/ml) für 30 min. Nachfolgend wurden die Kryostatschnitte erneut mit PBS gewaschen, bevor das AB-Reagenz für weitere 30 min auf die Schnitte gegeben und diese anschließend mit dem Peroxidase-Substrat (1-3 Tropfen) versetzt wurden. Das in dem Substrat enthaltene Chromogen DAB lagert sich dabei an das Enzym an und präzipitiert. Dabei kommt es zu einer makroskopisch sichtbaren Färbung an der Stelle des Antigens, dessen Intensität von der Menge des vorhandenen Antigens abhängig ist. Um die angefärbten Strukturen besser in den histologischen Kontext einordnen zu können, wurde zusätzlich noch eine Kernfärbung mit Hämalaun (4-5 min) durchgeführt. Nach Bläuen der Schnitte in lauwarmem Leitungswasser wurden die Schnitte abschließend in Aquatex eingedeckt.

Die Auswertung der Präparate erfolgte mit Hilfe eines Okularnetzgitters unter dem Auflichtmikroskop. Bei 400facher Vergrößerung wurden 20 Felder (1 GF = 0,09 mm²) ausgezählt und daraus die Anzahl markierter Zellen pro mm² berechnet.

3.6. Experimentelles Protokoll

Wesentliches Ziel der Untersuchungen war es, eine Strategie für eine bakterielle Immuntherapie mit *S. pyogenes* zu evaluieren. Hierzu erfolgten basierend auf *in vitro* Vorarbeiten, umfangreiche Analysen zur Wirksamkeit der Bakterien beim Pankreaskarzinom der Maus. Zusätzlich wurde die immunologische Reaktion des Tieres infolge der gezielt gesetzten Infektion zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht.

3.6.1. Versuchsgruppen

Zunächst erhielten alle Tiere eine s. c. Injektion von 1×10^6 Panc02 Zellen in die rechte Flanke. Nach Tumoretablierung erfolgte die Randomisierung. Dabei wurde zur Evaluierung der optimalen therapeutischen, aber nicht toxisch letalen Dosis zunächst 15 Tieren *S. pyogenes* in den Konzentrationen 10^5 cfu/ml, 10^6 cfu/ml und 10^7 cfu/ml i. t. appliziert.

Anschließend erhielten tumortragende Tiere (je $n=28$) eine einmalige i. t. Injektion des M49wt bzw. der SLS μ in der entsprechenden Dosierung (siehe 3.3.1.). Bei 28 weiteren Tieren wurde das Lysat eingesetzt. Die Tiere erhielten ebenfalls eine i. t. Injektion an den Tagen 9 und 13 ab Therapiebeginn (siehe 3.3.1.).

Kontrolltieren wurde die Vehikelsubstanz PBS bzw. das PlyC $_1$ i. t. appliziert. Die Anzahl der Vehikel-behandelten Tiere betrug $n=3$ pro Untersuchungszeitpunkt. Zur Dokumentation des Tumorstwachstums erfolgte bei weiteren tumortragenden Kontrolltieren keine i. t. Injektion ($n=3$ pro Untersuchungszeitpunkt). Bei fünf zusätzlichen Tieren wurden keine dieser Interventionen vorgenommen, sie dienten zur Erfassung physiologischer Parameter als unbehandelte Kontrolltiere.

Um den Verlauf des Tumorstwachstums sowie den Erfolg der bakteriellen Immuntherapie zu beurteilen, wurden die Tiere in 4 Gruppen ($n=7$) unterteilt. So erfolgte jeweils an den Tagen 7, 14, 21 und 28 nach Therapiebeginn die Präparation, wie unter 3.2.3. ausführlich beschrieben. Die Sektion der Kontrolltiere erfolgte nach identischem Protokoll.

Bei erfolgreich therapierten Tieren wurde zusätzlich der Tumor-Rechallenge durchgeführt ($n=6$ pro Gruppe). Die Ausbildung sichtbarer Tumoren wurde daraufhin über einen Gesamtzeitraum von 28 Tagen nach der zweiten Tumorzellapplikation auf der kontralateralen Seite zum ersten Tumor beobachtet. Abschließend erfolgten Blut- und Organentnahme wie oben beschrieben.

3.6.2. Versuchsablauf

Zu entsprechenden Zeitpunkten nach Therapiebeginn bzw. Vehikelexposition erfolgte die chirurgische Präparation der Tiere. Hierzu wurde zunächst die retrobulbäre Blutentnahme vorgenommen. Anschließend wurde der Tumor für histologische und immunhistochemische Analysen reseziert. Zusätzlich erfolgte die Entnahme von Lunge und Leber. Für

durchflusszytometrische und immunologische Untersuchungen wurde zusätzlich die Extirpation der Milz, der paraaortalen und mesenterialen Lymphknoten durchgeführt (Abb. 7).

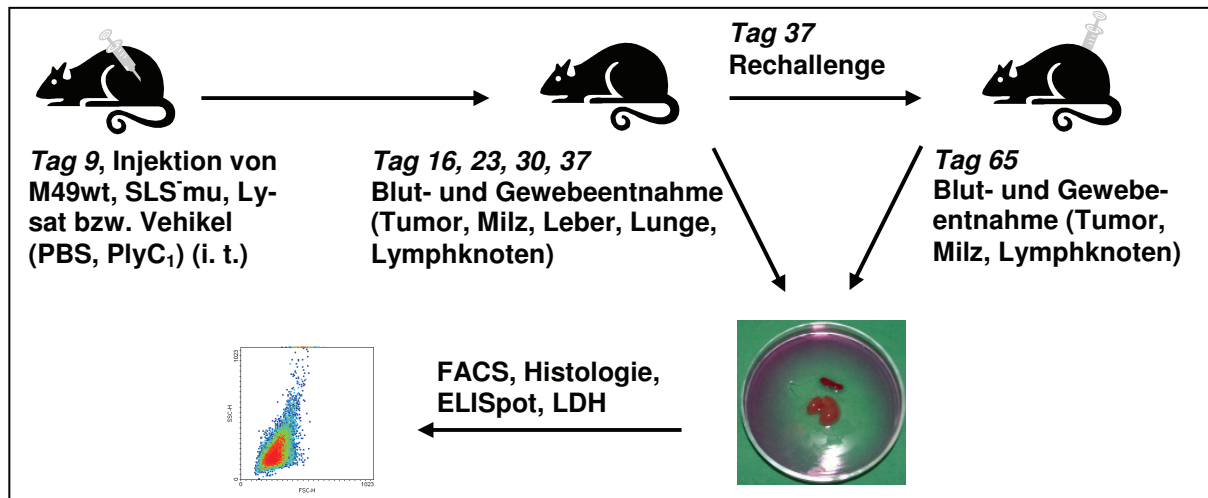


Abb. 7: Experimentelles Protokoll zum Versuchsablauf. Tiere mit einem s. c. Tumor wurden mit der entsprechenden Therapie behandelt oder erhielten die Vehikellösung. An den Tagen 16, 23, 30 und 37 erfolgte jeweils die Euthanasie der Tiere zur nachfolgenden Blut- und Gewebeentnahme. Für Rechallenge-Untersuchungen wurden Tieren am Tag 28 nach Therapiebeginn (= Tag 37) erneut Tumorzellen in die kontralaterale Flanke injiziert und das Tumorstadium über weitere 28 Tage kontrolliert.

3.7. Statistik

Alle Werte sind als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes angegeben (MW \pm SEM). Die Mittelwerte der einzelnen Parameter rekrutieren sich aus der Anzahl der Versuchstiere. Vehikel-behandelte Tiere und Tumorkontrolltiere wurden aufgrund der nicht signifikanten Abweichungen innerhalb der bestimmten Parameter zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten zu einer Gruppe zusammengefasst. Dies gilt sowohl für die graphischen Darstellungen, als auch für die statistischen Evaluierungen. Die Werte der unbehandelten Kontrolltiere dienten als Normwerte und sind mit in den graphischen Darstellungen aufgeführt, jedoch nicht in die statistische Analyse miteinbezogen.

Die statistische Auswertung erfolgte unter Verwendung des Softwarepaketes SigmaStat (Jandel Cooperation St. Rafael, CA, USA). Für die *in vitro* Infektionsversuche erfolgte der Vergleich zwischen den infizierten und den nicht-infizierten Zellen mit Hilfe des Mann-Whitney U-Test. Dies gilt ebenso für den Vergleich zwischen den Therapiegruppen und den Vehikel-behandelten Kontrollgruppen bzw. den Tumorkontrollgruppen. Die Analyse der Überlebensdaten erfolgte mit Hilfe der Kaplan-Meier-Methode. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt.

IV ERGEBNISSE

4.1. Untersuchungen zum Wirkungsverhalten von *S. pyogenes* auf Zielzellen

Die toxische Wirkung von Bakterien der Gattung *S. pyogenes* gegenüber humanen Epithelzellen ist bekannt und gut charakterisiert (132, 133). Bislang erfolgten jedoch keine Untersuchungen an Pankreaskarzinomzellen. Vor dem Hintergrund eines potentiellen immuntherapeutischen Einsatzes von Gruppe A Streptokokken beim Pankreaskarzinom wurde in den folgenden Voruntersuchungen die Wirkung verschiedener *S. pyogenes* Serotypen auf murine und humane Pankreaskarzinomzellen erfasst.

4.1.1. Adhärenz und Internalisierungsverhalten

In einem ersten Ansatz sollte zunächst das Adhärenz- und Internalisierungsverhalten verschiedener Serotypen gegenüber den humanen Zelllinien Panc-1, BxPC-3 und Capan-2, sowie der murinen Zelllinie Panc02 analysiert werden. Hierbei zeigte sich, dass die Tumorzellen serotypabhängig unterschiedlich stark mit den Bakterien infiziert wurden. Dies gilt insbesondere für die Panc02 Zellen. Während die Serotypen M3wt und M49wt ein vergleichbares Adhärenzverhalten gegenüber den murinen Zellen aufwiesen (ca. 14 %), betrug die Adhärenzrate des Stammes M6wt nur $4,6 \pm 0,6$ % (Abb. 8). Der M18wt zeigte mit $19,5 \pm 15,5$ % die höchste Adhärenzrate, jedoch konnten keine invasiven Bakterien nachgewiesen werden.

Dies lässt darauf schließen, dass die Adhärenz ohne spezifische Interaktion von Oberflächenstrukturen der Bakterien und der Wirtszellen erfolgt. Die Deletion des funktionellen Exotoxins SLS führt dahingegen zu einer verstärkten Adhärenz an die Panc02 Zellen. Abb. 8 zeigt, dass der Anteil adhärenter SLS⁻mu Bakterien gegenüber dem M49wt um 8 % erhöht ist. Die Invasivität, welche die eigentliche Infektion der Zielzelle darstellt, ist jedoch im Vergleich zum Wildtyp mit $1,2 \pm 0,1$ % deutlich herabgesetzt (Abb. 8).

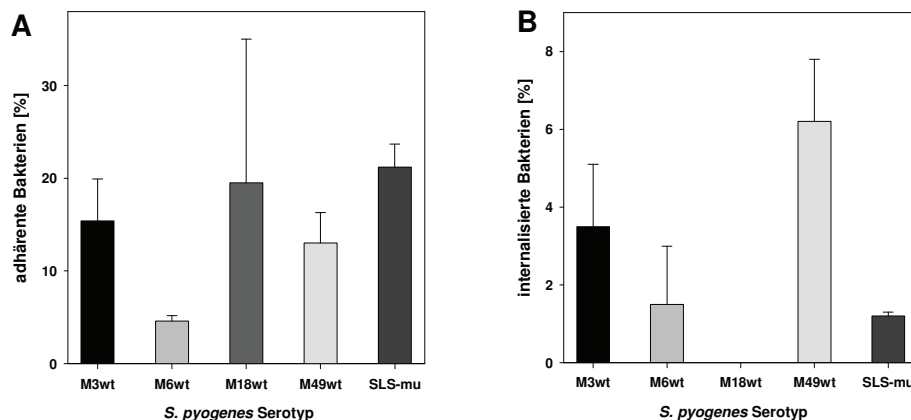


Abb. 8: Adhärenz- und Internalisierungsverhalten von *S. pyogenes* Serotypen gegenüber Panc02 Zellen. Angegeben ist der prozentuale Anteil (A) adhärenter bzw. (B) internalisierter Bakterien nach zwei Stunden Wachstum in der Zellkultur. Angegeben sind der MW \pm SEM, $n=3$.

Dies gilt ebenso für die Stämme M3wt und M6wt, bei denen der Anteil intrazellulär detektierter Bakterien stets geringer war als bei dem Stamm M49wt. Das differente Adhärenz- und Internalisierungsverhalten der untersuchten Stämme gibt somit erste Hinweise auf ein spezifisches Infektionsmuster der Pankreaskarzinomzellen. In weiterführenden Untersuchungen erfolgte die Analyse der Infektiösität von humanen Zellen, um potentielle Unterschiede im Adhärenz- und Internalisierungsverhalten herauszuarbeiten. Es zeigte sich, dass es serotypabhängig zu einer unterschiedlich starken Adhärenz an Panc-1, BxPC-3 bzw. Capan-2 Zellen kommt. Innerhalb der einzelnen Zelllinien wurden ebenfalls Differenzen beobachtet. Dies gilt in besonderem Maß für die Capan-2 Zellen. Bei keinem der getesteten Serotypen betrug die Adhärenzrate mehr als 5 % (Abb. 9). Demzufolge tragen Capan-2 Zellen keine Zielmoleküle auf ihrer Oberfläche, an die *S. pyogenes* bindet. Folglich liegt der Anteil an intrazellulären Erregern zwischen $2,3 \pm 1,6$ % bei dem Stamm M3wt und $0,8 \pm 0,5$ % bei dem Stamm M49wt (Abb. 9). Bei den Zelllinien Panc-1 und BxPC-3 wurden vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der bakteriellen Adhärenz und Internalisierung erhalten. Ein eindeutiges, spezifisches Bindungsmuster konnte im Rahmen der Versuche jedoch nicht herausgearbeitet werden. Gegenüber den Panc-1 Zellen zeigte der Serotyp M49wt das stärkste Adhärenzverhalten, an die BxPC-3 Zellen adhärten dahingegen vornehmlich M18wt Bakterien. Dies gilt in ähnlicher Weise auch für den Anteil intrazellulärer Streptokokken, der jedoch in keiner der Versuchsreihen über 5 % lag. Die Ergebnisse zeigen somit, dass *S. pyogenes* prinzipiell an humane Pankreaskarzinomzellen bindet, die Affinität der Bakterien jedoch stark zell- und serotypabhängig ist. Der molekulare Hintergrund, verbunden mit der Identifizierung potentieller Proteine, über die die Bakterien mit den Tumorzellen interagieren, ist bislang nicht bekannt.

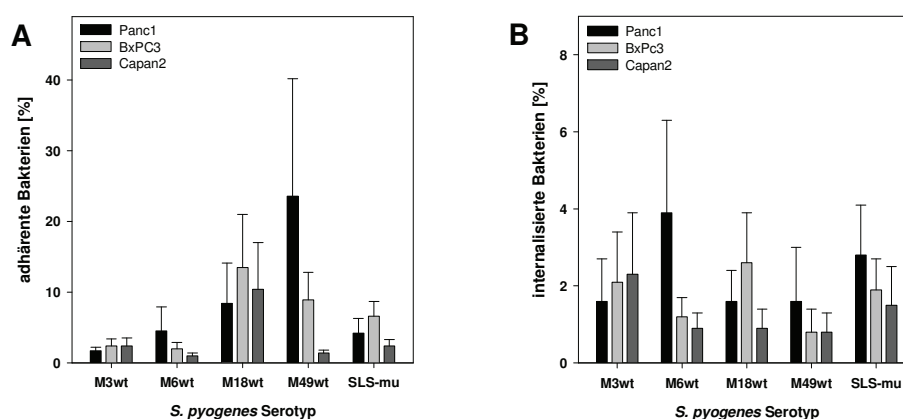


Abb. 9: Adhärenz- und Internalisierungsverhalten von *S. pyogenes* Serotypen gegenüber Panc-1 (■), BxPC-3 (□) und Capan-2 (▒) Zellen. Angegeben ist der prozentuale Anteil (A) adhärenter bzw. (B) internalisierter Bakterien nach zwei Stunden Wachstum in der Zellkultur. Angegeben sind der MW \pm SEM, $n=3$.

4.1.2. Qualitative und quantitative Apoptose- und Nekrosebestimmung in Tumorzellen

Um zu überprüfen, ob die Infektion der Pankreastumorzellen mit *S. pyogenes* prinzipiell eine Zellschädigung induziert, wurde in fluoreszenzmikroskopischen Analysen eine Differenzierung zwischen vitalen und avitalen Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen für 4 h bzw. 6 h mit dem jeweiligen Serotyp kokultiviert.

Die Untersuchungen ergaben, dass die Infektion der Panc02 Zellen mit *S. pyogenes* zeitabhängig einen Zelltod induziert. Dabei wurden erneut Unterschiede zwischen den einzelnen Serotypen beobachtet. Während der M6wt und der M18wt ausschließlich eine moderate Toxizität gegenüber den Zellen zeigten, betrug der Anteil avitaler Panc02 Zellen nach vierstündiger Infektion mit dem M49wt und der SLS-negativen Mutante $29,0 \pm 6,1$ % bzw. $39,5 \pm 6,1$ % (Abb. 10). Vergleichbare Werte wurden mit dem M3wt erzielt, was in Konkordanz zu dem Adhärenz- und Internalisierungsverhalten steht. Längere Inkubationszeiten mit dem M49wt und der SLS⁻mu führten zu einem noch massiveren Anstieg an toten Zellen, welcher im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollzellen ($4,5 \pm 1,4$ %) mit $75,8 \pm 4,5$ % bzw. $59,2 \pm 5,4$ % signifikant erhöht war ($p < 0,05$ vs. Kontrolle). Diese Beobachtungen bestätigen damit erste Hinweise auf eine serotypabhängige, spezifische Toxizität von *S. pyogenes* gegenüber den Zielzellen.

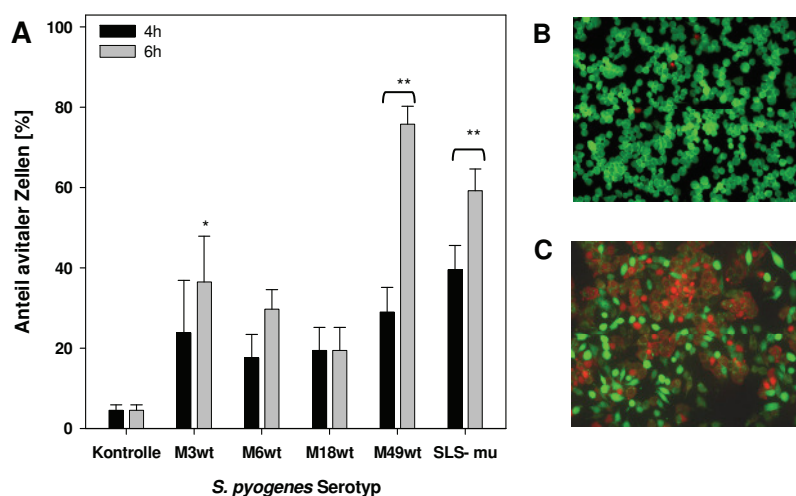


Abb. 10: Quantitative Analyse des zytotoxischen Potentials von *S. pyogenes* Serotypen gegenüber Panc02 Zellen. (A) Dargestellt ist der prozentuale Anteil avitaler Zellen nach 4 h und 6 h Koinkubation ($n=5$). Angegeben sind der $MW \pm SEM$. Mann-Whitney U-Test: * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; ** $p < 0,001$ vs. Kontrolle. (B, C) Repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Panc02 Zellen (B) ohne bakterielle Infektion und (C) nach 6 h Infektion mit dem Serotyp M49wt. Vitale Zellen, mit einer intakten Zellmembran zeigen eine deutliche Grünfluoreszenz. Zellen, die infolge der bakteriellen Infektion irreversibel geschädigt sind, können den Avitalfarbstoff Ethidiumbromid nicht ausschließen und stellen sich rot dar. Originalvergrößerung 400fach.

Vergleichbare Ergebnisse wurden im Rahmen der Untersuchungen zum toxischen Potential von *S. pyogenes* gegenüber den humanen Zellen Panc-1, BxPC-3 und Capan-2 erhoben (Abb. 11). Eine Zellschädigung in den Tumorzellen wurde erneut insbesondere durch den

Wildtypstamm M49 induziert. 6 Stunden nach Infektion waren lediglich 6 % der Panc-1 Zellen und 14 % der BxPC-3 Zellen vital ($p < 0,005$ vs. Kontrolle). Alle anderen Serotypen führten auch nach längerer Inkubationszeit ausschließlich zu einer marginalen Zellschädigung (Abb. 11), wodurch erstmals belegt werden konnte, dass *S. pyogenes* gegenüber humanen Pankreaskarzinomzellen zytotoxisch ist.

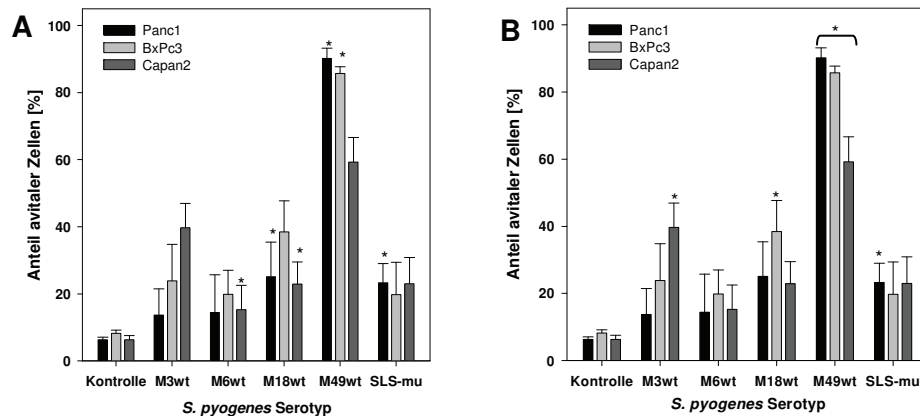


Abb. 11: Quantitative Analyse zum zytotoxischen Potential von *S. pyogenes* Serotypen gegenüber Panc-1 (■), BxPC-3 (□) und Capan-2 (▒) Zellen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil Ethidiumbromid-positiver Zellen nach (A) 4 h und (B) 6 h Koinkubation (jeweils $n=5$). Angegeben sind der MW \pm SEM. Mann-Whitney U-Test: $*p < 0,05$ vs. Kontrolle.

In ergänzenden Untersuchungen wurden die durch die Bakterien vermittelten zytotoxischen Effekte, sowie eine potentielle Apoptose-Induktion näher charakterisiert. Der Nachweis (nekrotischer) Zellen mit defekter Membranintegrität erfolgte anhand der Bestimmung extrazellulärer LDH im Zellkulturüberstand, apoptotische Zellen wurden mittels durchflusszytometrischer Messung des Sub-G1-Peaks identifiziert. Dabei zeigten sich sowohl in der vermittelten Zytotoxizität, als auch in der Apoptoseinduktion starke Differenzen.

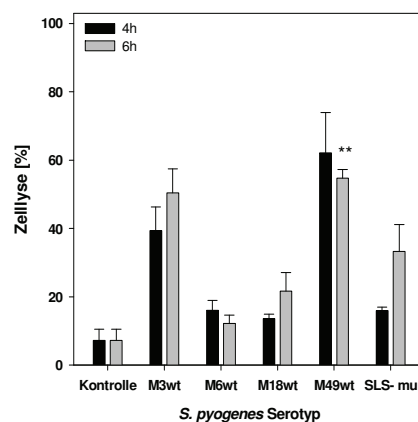


Abb. 12: Quantitative Analyse zur LDH-Freisetzung von Panc02 Zellen nach Infektion mit *S. pyogenes*. Angegeben ist der prozentuale Anteil an extrazellulärer LDH in Relation zu einer Positivkontrolle (= 100 %) nach 4 h und 6 h Koinkubation ($n=3$). Angegeben sind der MW \pm SEM. Mann-Whitney U-Test: $**p < 0,001$ vs. Kontrolle.

Die Serotypen M3wt und M49wt induzierten deutliche Zellläsionen in den Tumorzellen (Abb. 12). Entsprechend stieg der Anteil an extrazellulärer LDH gegenüber den nicht-infizierten Kontrollzellen nach 4 h auf $39,3 \pm 7,0$ % (M3wt) bzw. $62,1 \pm 11,8$ % (M49wt). Die anderen Serotypen (M6wt, M18wt, SLS⁻mu) führten hingegen nur zu einer marginalen Schädigung der Zielzellen, es konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den nicht-infizierten Kontrollzellen detektiert werden.

Um nun nachzuweisen, ob die durch die Bakterien vermittelte Zytotoxizität auch auf Apoptose beruht, wurde in einem parallelen Ansatz die durchflusszytometrische Sub-G1-Peak Messung durchgeführt. Die Serotypen M3wt und M49wt induzierten 4 h nach der Infektion in $21,7 \pm 3,9$ % bzw. $70,6 \pm 13,8$ % (vs. Kontrolle $2,1 \pm 0,5$ %) der Panc02 Zellen eine Apoptose (Abb. 13 A). Interessanterweise wurde auch durch die SLS⁻ Mutante ein deutlicher Anstieg von Sub-G1-Zellen beobachtet, der kennzeichnend für Apoptose ist. Die zuvor, im Rahmen der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen, beobachtete Zellschädigung ist demzufolge auch auf apoptotische Mechanismen zurückzuführen. Die anderen Serotypen zeigten nur eine geringe Wirksamkeit, folglich wurden durchflusszytometrisch nur wenige apoptotische Zellen nachgewiesen, welche ebenfalls keine Veränderung der Zellzyklusverteilung zeigten (Abb. 13).

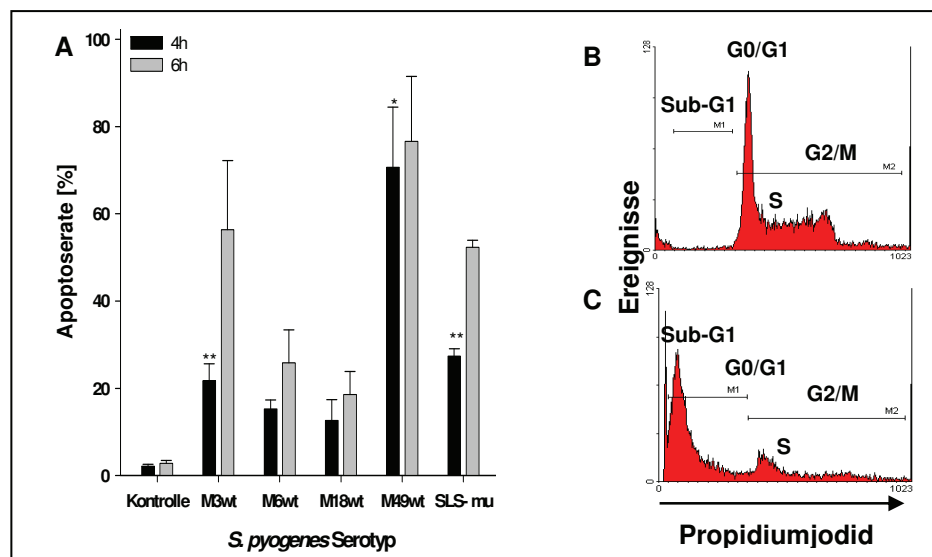


Abb. 13: Quantitative Analyse der Apoptoserate in Panc02 Zellen mit Hilfe durchflusszytometrischer Sub-G1-Peak Messung. (A) Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Zellen mit Sub-G1-DNA Gehalt nach 4 h und 6 h Koinkubation ($n=5$). Angegeben sind der MW \pm SEM. Mann-Whitney U-Test: * $p<0,05$ vs. Kontrolle, ** $p<0,001$ vs. Kontrolle. (B, C) Repräsentative durchflusszytometrische Darstellungen von Panc02 Zellen im Histogramm (B) ohne bakterielle Infektion und (C) nach 6 h Infektion mit dem Serotyp M49wt. Apoptotische Zellen zeigen infolge der DNA-Fragmentierung einen deutlichen Sub-G1-Peak (Die Zellzyklusphasen sind dargestellt: M1 = Sub-G1, M2 = G0/G1-, S-, G2/M - Phase).

Anschließend wurde die Zytotoxizität der Bakterien gegenüber den humanen Tumorzellen analysiert. Dabei zeigten sich wiederum deutliche Unterschiede innerhalb der einzelnen

Serotypen. In allen humanen Tumorzellen wurden nach Infektion mit dem Serotyp M49wt erhöhte Mengen an extrazellulärer LDH nachgewiesen, welche für Nekrose charakteristisch ist. Dies gilt besonders für die Zelllinie Panc-1, bei denen bis zu 69 % der Zellen lysiert wurden. Hingegen konnte durch die Inkubation mit den anderen Serotypen auch nach 6 h keine signifikante Zellschädigung nachgewiesen werden (Abb. 14).

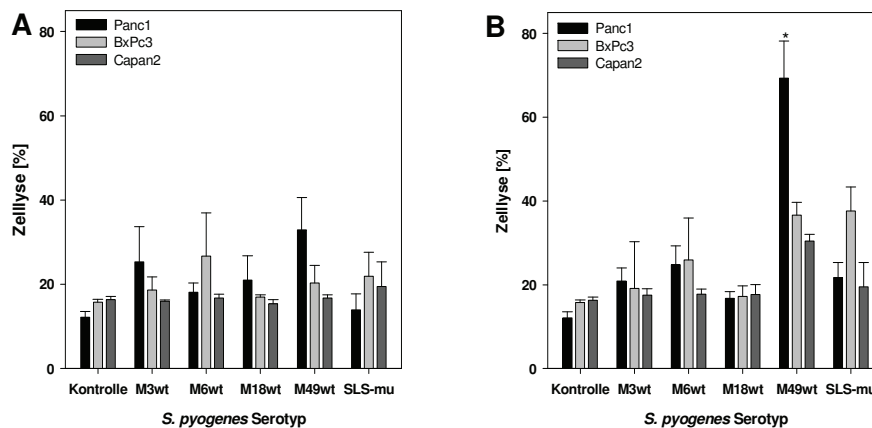


Abb. 14: Quantitative Analyse zur LDH-Freisetzung von Panc-1 (■), BxPC-3 (□) und Capan-2 (■) Zellen nach Infektion mit *S. pyogenes*. Angegeben ist der prozentuale Anteil an extrazellulärer LDH in Relation zu einer Positivkontrolle (= 100 %) nach (A) 4 h und (B) 6 h Koinkubation ($n=3$). Angegeben sind der MW \pm SEM. Mann-Whitney U-Test: * $p<0,05$ vs. Kontrolle.

Das unterschiedliche Potential der einzelnen Serotypen zeigte sich noch deutlicher bei der durchflusszytometrischen Analyse apoptotischer Zellen. Hierbei wurde nach der Behandlung mit dem M49wt in allen Tumorzellen ein deutlicher Anstieg der Sub-G1-Fraktion beobachtet (Abb. 15). Die Zahl der apoptotischen Zellen schwankte nach 4 h zwischen 53 % (Capan-2 Zellen) und 80 % (Panc-1 Zellen) und zeigte im weiteren Zeitverlauf eine kontinuierliche Zunahme. Das zytotoxische Potential der anderen Serotypen war entsprechend gering, zu keiner Zeit wurde eine signifikante Zunahme apoptotischer Tumorzellen beobachtet (Abb. 16). In einigen Zelllinien konnte man im Vergleich zu nicht-infizierten Kontrollzellen durch die Infektion mit den Bakterien in den DNA-Profilen einen G1-Arrest erkennen, jedoch keine Apoptose.

Die beobachteten zytotoxischen Effekte sind somit eher auf Apoptose, als auf Nekrose zurückzuführen, belegen jedoch eindeutig, dass der Serotyp M49wt die stärkste therapeutische Wirksamkeit gegenüber den eingesetzten Zelllinien besitzt.

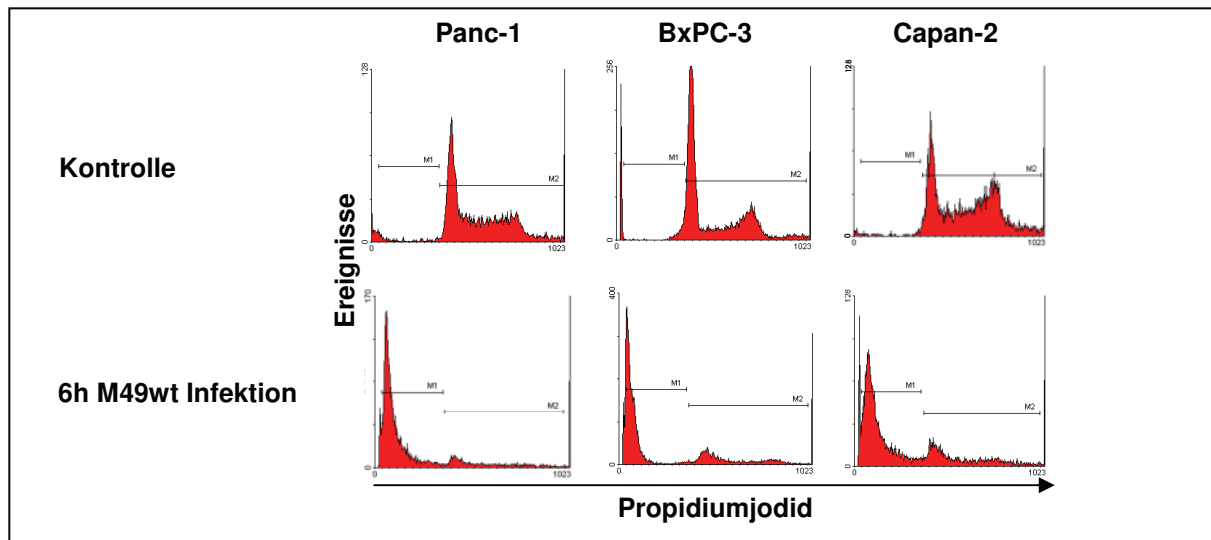


Abb. 15: Repräsentative durchflusszytometrische Darstellungen von Panc-1, BxPC-3 und Capan-2 Zellen im Histogramm ohne bakterielle Infektion und nach 6h Infektion mit dem Serotyp M49wt. Apoptotische Zellen zeigen infolge der DNA-Fragmentierung einen deutlichen Sub-G1-Peak (Die Zellzyklusphasen sind dargestellt: M1 = Sub-G1, M2 = G0/G1-, S-, G2/M - Phase).

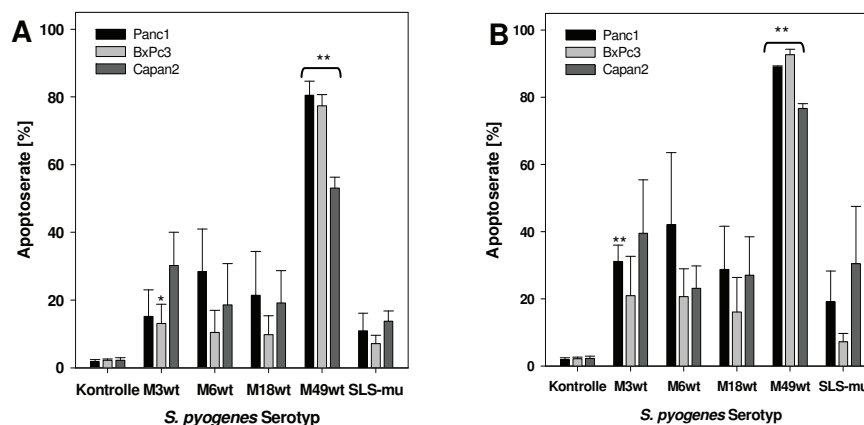


Abb. 16: Quantitative Analyse der Apoptoserate in Panc-1 (■), BxPC-3 (□) und Capan-2 (▒) Zellen mit Hilfe durchflusszytometrischer Sub-G1-Peak Messung. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Zellen mit Sub-G1-DNA Gehalt nach (A) 4 h bzw. (B) 6 h Koinkubation (n=5). MW ± SEM. Mann-Whitney U-Test: *p<0,05 vs. Kontrolle, **p<0,001 vs. Kontrolle.

4.1.3. Zusammenfassung

Insgesamt zeigten die Untersuchungen zur Analyse des toxischen Potentials von *S. pyogenes* gegenüber Pankreastumorzellen, dass

- die Bakterien bei geringer Adhärenz- und Invasionsraten ein spezifisches Infektionsmuster aufweisen, welches stark serotypabhängig ist.
- das Infektionsmuster der murinen Panc02 Zellen mit dem der humanen Pankreaskarzinomzellen vergleichbar ist.

- der Serotyp M49wt die stärkste Affinität gegenüber allen getesteten Zelllinien aufweist.
- der M49wt in allen Zellen eine signifikante Zellschädigung induziert, welche sowohl apoptotisch, als auch nekrotisch ist.

Auf der Basis der erhobenen *in vitro* Daten, wurde der Serotyp M49wt konsequenterweise für die nachfolgende bakterielle Immuntherapie eingesetzt.

4.2. Untersuchungen zur therapeutischen Wirksamkeit von *S. pyogenes* *in vivo*

4.2.1. Überlebenskurve nach Kaplan-Meier zur Bestimmung der maximal tolerablen Dosis für die Antitumorthherapie

Für den therapeutischen Einsatz des bisher im Panc02-Tumormodell noch nicht verwendeten Bakterienstammes *S. pyogenes* M49wt, mussten zunächst Voruntersuchungen zur Determination der maximal verträglichen Dosis durchgeführt werden. Um den lokalen Effekt zu maximieren und die Gefahr einer potentiellen systemischen Infektion zu minimieren, wurden die Bakterien einmalig i. t. appliziert.

Nach Behandlung der tumortragenden Tiere mit drei verschiedenen bakteriellen Infektionszahlen (10^5 cfu/ml, 10^6 cfu/ml und 10^7 cfu/ml) zeigte sich eine dosisabhängige Toxizität. Tiere, denen die höchste bakterielle Dosis appliziert wurde, entwickelten innerhalb weniger Tage klinisch eindeutige Krankheitszeichen, wie Kachexie und Ataxie. 9 Tage nach i. t. Infektion waren, bedingt durch die hohe bakterielle Last, bereits 50 % der Tiere verstorben (Abb. 17). Dahingegen betrug die Letalität bei Tieren, denen die mittlere (10^6 cfu/ml) und niedrige (10^5 cfu/ml) Dosis appliziert wurde, auch nach 28 Tagen <15 % (Abb. 17). Für die anschließende immuntherapeutische Anwendung wurde die höchste tolerable Dosis (10^6 cfu/ml) gewählt.

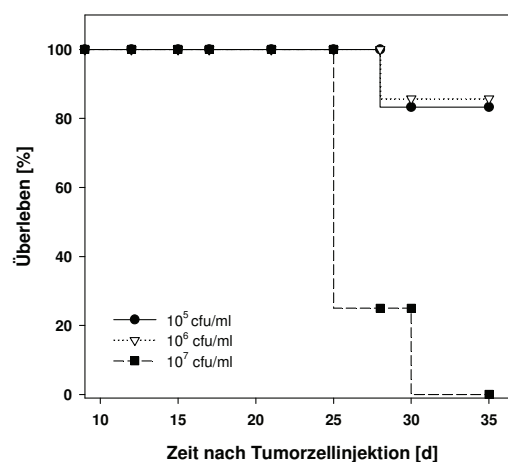


Abb. 17: Überlebenskurve nach Kaplan-Meier. Zur Evaluierung einer nicht-toxisch letalen Dosis erhielten Tiere mit einem etablierten s. c. Panc02-Tumor eine einmalige i. t. Injektion von *S. pyogenes* Serotyp M49wt in drei verschiedenen Dosierungen. Die Tiere wurden über den Zeitraum von 28 Tagen beobachtet. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an überlebenden Tieren im Zeitverlauf ($n=5$ pro Gruppe).

Bei einer weiteren Gruppe gesunder, tumorfreier Tiere wurden die Bakterien zusätzlich einmalig s. c. in die Flanke injiziert, um potentielle toxische Effekte im gesunden Organismus beurteilen zu können. Bei den Tieren zeigten sich keine Veränderungen, lediglich im Bereich der Injektionsstelle wurden innerhalb der ersten zwei Wochen nach bakterieller Injektion leichte nekrotische Läsionen beobachtet, welche jedoch keinen Einfluss auf das Verhalten der Tiere hatten und ebenso nicht zu hämatologischen oder immunologischen Alterationen führten.

4.2.2. Vergleich der therapeutischen Wirksamkeit des M49wt, der SLS⁻mu und des Lysates beim Pankreaskarzinom

Nach Evaluierung einer geeigneten Infektionszahl wurde detailliert untersucht, welche der gewählten Therapieschemata *in vivo* einen antitumoralen Effekt aufweisen. Hierzu wurden etablierte s. c. Pankreastumoren entweder mit *S. pyogenes* Serotyp M49wt, der SLS⁻mu oder dem Lysat (i. t. Injektion) behandelt. Die Tumoren wurden anschließend über einen Gesamtzeitraum von 28 Tagen auf Rückbildung hin überwacht. Als Kontrolle dienten jeweils tumortragende Tiere, die mit den entsprechenden Vehikel-Lösungen behandelt bzw. bei denen keine Intervention vorgenommen wurde.

Die einzelnen Behandlungen hatten unterschiedliche therapeutische Effekte. Die einmalige i. t. Injektion des M49wt führte zunächst zu keiner signifikanten Beeinflussung des Tumorstadiums. Die Tumoren zeigten innerhalb der ersten vier Tage nach Therapie ein progressives Wachstum und erreichten ein Volumen von $128,6 \pm 11,8 \text{ mm}^3$ (Abb. 18). Im weiteren Verlauf kam es dann zur Stagnation des Tumorstadiums. Die Tumoren ulzerierten deutlich sichtbar und bildeten sich innerhalb von 28 Tagen bei fünf von sieben Tieren vollständig zurück (Abb. 19). Bei zwei Tieren war am Tag 28 noch ein kleiner Randwall des Tumors makroskopisch nachweisbar ($23,8 \pm 9,5 \text{ mm}^3$ vs. Vehikel-PBS $1228,1 \pm 220,2 \text{ mm}^3$, $p < 0,001$). Bei Tieren, denen die SLS⁻ Deletionsmutante i. t. appliziert wurde, zeigte sich, dass der Verlust des Toxins SLS, auch den therapeutischen Effekt fast aufhob. Es kam erst im späteren Verlauf zu einer leichten Reduktion des Tumorstadiums. Die, gegenüber den Kontrolltieren leichte, Wachstumsverzögerung ging mit der Ausbildung von nekrotischen und ulzerierten Tumorbereichen einher (Abb. 19). Das mittlere Volumen lag nach 28 Tagen bei $771,9 \pm 128,1 \text{ mm}^3$ (Abb. 18).

Einen deutlichen, mit denen des Wildtypstammes M49 vergleichbaren, Einfluss auf das Wachstum der Tumoren hatte demgegenüber die Behandlung mit dem bakteriellen Lysat, welches zweimal i. t. appliziert wurde. Bei zwei von sieben Tumoren (29 %) wurde eine komplette Regression beobachtet. Bei den anderen Tumoren kam es 21 Tage nach Therapiebeginn zu einer leichten Progression, das Volumen der Tumoren blieb jedoch gegenüber den Kontrolltieren signifikant erniedrigt ($266,5 \pm 54,9 \text{ mm}^3$ vs. $1572,1 \pm 267,4 \text{ mm}^3$, $p < 0,001$). Nach 28 Tagen konnte makroskopisch nur ein kleiner Randwall beobachtet werden, in dem

sich fast keine vitalen Tumorzellen befanden (Abb. 19). Die Tiere waren somit nicht komplett geheilt, das Tumorstadium war jedoch im Vergleich zu den Vehikel-PlyC₁-behandelten Tieren um >80% reduziert (Abb. 18).

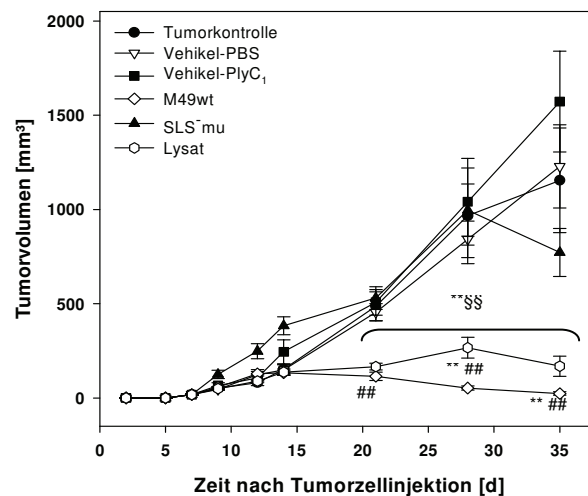


Abb. 18: Antitumorale Wirksamkeit der jeweiligen Therapieschemata – Verlauf des Tumorstadiums. Tiere mit einem etablierten s. c. Panc02-Tumor wurden entweder mit *S. pyogenes* Serotyp M49wt, der SLS mu oder dem Lysat behandelt (je $n=7$ pro Zeitpunkt) bzw. erhielten äquivalente Volumina der Vehikellösung (je $n=12$). Tiere ohne i. t. Injektion dienten als Tumorkontrolltiere ($n=12$). Die Erfassung des Körpergewichtes erfolgte einmal pro Woche. Dargestellt ist das mittlere Tumorstadium über einen Zeitraum von 35 Tagen. Angegeben sind der MW \pm SEM. Mann-Whitney U-Test: ** $p<0,001$ vs. Tumorkontrolle, ## $p<0,001$ vs. Vehikel-PBS, §§ $p<0,001$ vs. Vehikel-PlyC₁.

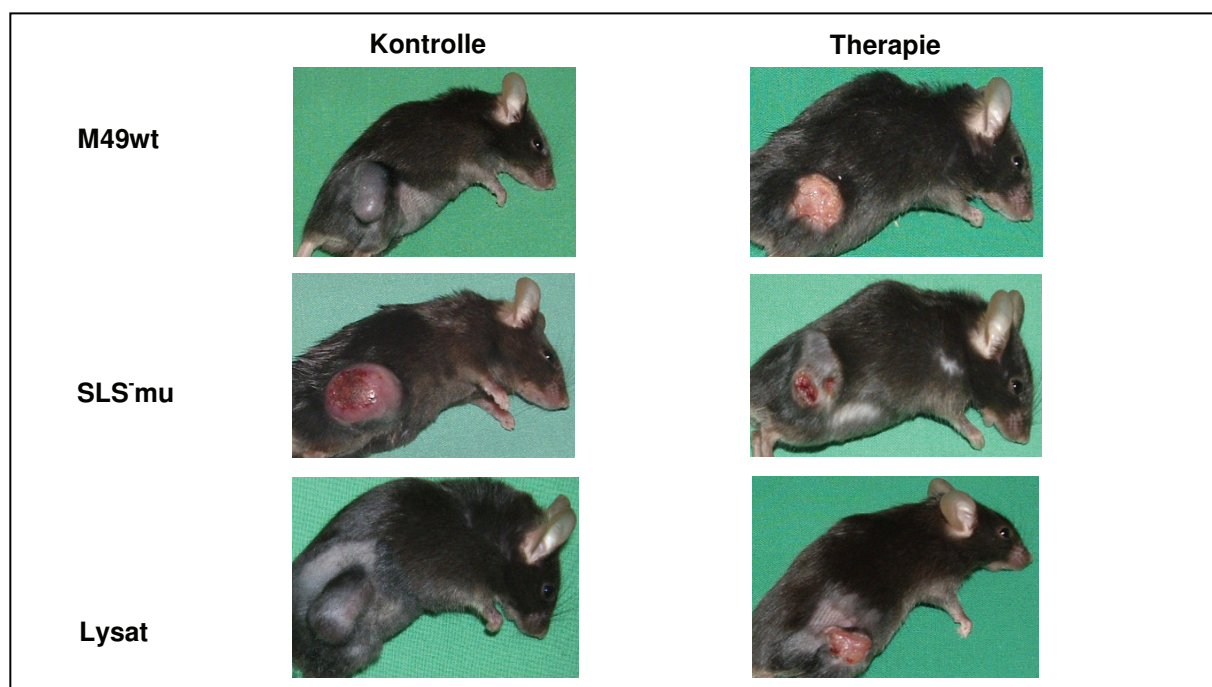


Abb. 19: Repräsentative Darstellungen von tumortragenden Tieren zum Zeitpunkt 28 Tage, die entweder mit *S. pyogenes* Serotyp M49wt, der SLS mu oder dem Lysat behandelt wurden. Kontrolltiere erhielten äquivalente Volumina der Vehikellösung. Die Behandlung mit dem M49wt und dem Lysat führte zu einer deutlichen Tumorstadiumsregression. Die SLS mu induzierte dahingegen nur eine marginale Reduktion des Tumors.

Bei der makroskopischen Analyse der inneren Organe wurden keine pathologischen Veränderungen, wie z. B. Gewebnekrosen oder Hämorrhagien beobachtet. Auffällig war jedoch eine massive Splenomegalie (ca. 7-8fach vergrößerte Milz), welche exklusiv in den Tieren beobachtet wurde, die zuvor lokal mit vitalen Bakterien (M49wt, SLS μ) infiziert wurden. Gleichzeitig wurden aus diesen Milzen bis zu zehnmal mehr Zellen isoliert, als aus denen Lysat-behandelter Tiere, welche ausschließlich leicht vergrößerte Milzen hatten (nicht gezeigt). Einhergehend mit diesen Beobachtungen wurde keine Lysat-vermittelte Toxizität beobachtet. Die Überlebensrate der Tiere betrug 100 %, wohingegen die Applikation vitaler Bakterien bei jeweils zwei Tieren zu Komplikationen (Lethargie der Tiere, Anorexie, Ataxie) führte, welche eine Euthanasie der Tiere verlangten. Insgesamt war die Toxizität der Bakterien gegenüber den Tieren jedoch gering, die Überlebensrate betrug über 80 % (Abb. 20A). Der Vergleich des Körpergewichts aller Gruppen ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied, obwohl bei behandelten Tieren eine transiente Gewichtsabnahme verzeichnet wurde (Abb. 20B).

Insgesamt belegen die Untersuchungen, dass sowohl vitale Bakterien von *S. pyogenes* als auch avitale bakterielle Komponenten therapeutisches Potential besitzen. Die Daten lassen darüber hinaus den Schluss zu, dass das Toxin SLS, dessen zytolytische Wirksamkeit bekannt ist, einen entscheidenden Einfluss auf den Erfolg der Therapie hat.

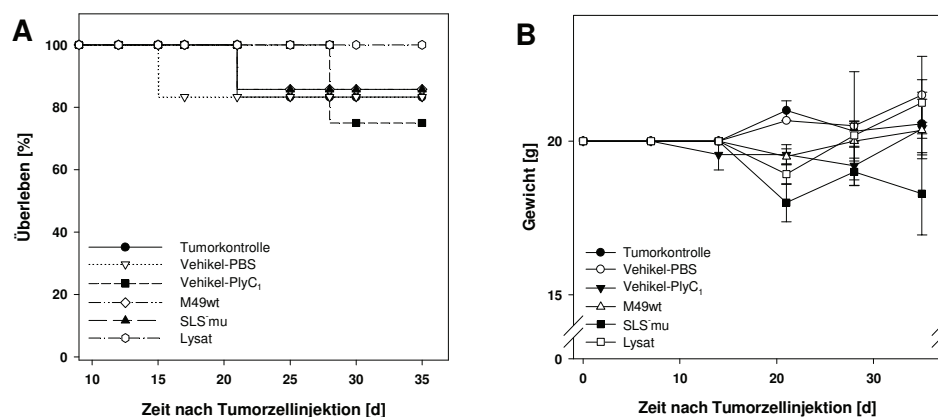


Abb. 20: Antitumorale Wirksamkeit der jeweiligen Therapieschemata (A) Überlebenskurve nach Kaplan-Meier - Dargestellt ist der prozentuale Anteil überlebender Tiere im Zeitverlauf. (B) Gewichtsverlauf - Dargestellt ist das Körpergewicht der Tiere im Zeitverlauf. Tiere mit einem etablierten s. c. Panc02-Tumor wurden entweder mit *S. pyogenes* Serotyp M49wt, der SLS μ oder dem Lysat behandelt (je $n=7$ pro Zeitpunkt) bzw. erhielten äquivalente Volumina der Vehikellösung (je $n=12$). Tiere ohne i. t. Injektion dienten als Tumorkontrolltiere ($n=12$).

4.2.3. Analyse des Wachstums von Tumoren in Rechallenge-Untersuchungen

Um die Funktionalität der induzierten antitumoralen Immunantwort zu überprüfen, wurden Tieren, die den Tumor aufgrund der Therapie zurückgebildet hatten, erneut Panc02 Zellen auf der kontralateralen Flanke s. c. injiziert und das Wachstum sichtbarer Tumoren über ins-

gesamt 28 Tage überprüft. In diese Rechallenge-Untersuchungen wurden ausschließlich Tiere eingeschlossen, die zuvor mit dem Wildtypstamm M49 bzw. mit dem Lysat behandelt wurden. Bei unvollständiger Tumorregression, wurde eine Nachresektion (= R0-Resektion) durchgeführt, sodass die Tiere zum Zeitpunkt der zweiten Tumorzellexposition vollständig tumorfrei waren. Als Kontrollgruppe, sowie zur Beurteilung der Immunreaktion bei alleiniger lokaler Infektion im Sinne einer „präventiven Vakzinierung“ wurde tumorfreien, aber zuvor mit dem *S. pyogenes* M49wt s. c. infizierten Tieren (= M49-Kontrolle) ebenfalls eine onkogene Dosis Panc02 Zellen in die kontralaterale Flanke appliziert.

Die Untersuchungen ergaben, dass erfolgreich therapierte Tiere die Tumoren zwar nicht vollständig abstoßen konnten, das Tumorstadium gegenüber naiven Tieren aber deutlich verzögert war (Abb. 21). Dies gilt interessanterweise sowohl für Tiere, die zuvor mit dem M49wt behandelt wurden, als auch für Lysat-behandelte Tiere, wodurch das Potential der Immuntherapie mit *S. pyogenes* belegt werden konnte. 28 Tage nach dem Rechallenge lag das mittlere Tumorstadium in beiden Gruppen bei ca. 230 mm³ und war damit gegenüber Kontrolltieren signifikant verringert, deren Tumorstadium allerdings im Vergleich zu naiven Tumorkontrolltieren ebenfalls leicht verzögert war. Dies lässt vermuten, dass auch die lokale Infektion mit *S. pyogenes* sekundär zur Beeinflussung des Wachstums von Panc02-Tumoren führt. Die M49wt Behandlung vermittelte ferner bei einem von sechs Tieren eine komplette Tumorstadiumregression. Zusammengefasst legen diese Untersuchungen den Schluss nahe, dass durch die eingesetzten Behandlungsschemata eine partielle protektive Immunität vermittelt wird, die einen deutlichen Einfluss auf das Tumorstadiumwachstum hat.

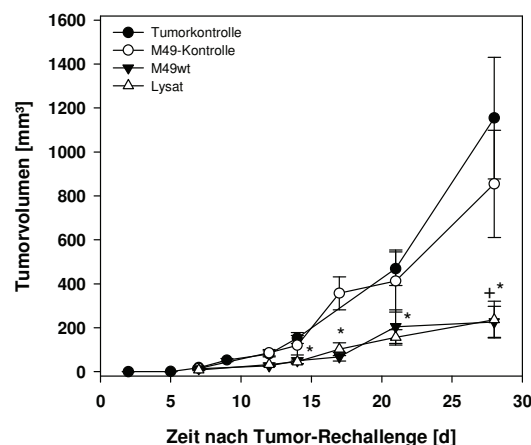


Abb. 21: Wachstumskinetik von Panc02-Tumoren in Rechallenge-Untersuchungen. Erfolgreich therapierten Tieren wurden erneut 1×10^6 Panc02 Zellen auf der kontralateralen Seite injiziert und die Bildung sichtbarer Tumoren kontrolliert. Dargestellt ist das mittlere Tumorstadium über einen Zeitraum von 28 Tagen (je $n=6$). Angegeben sind der MW \pm SEM. Mann-Whitney U-Test: + $p < 0,05$ vs. M49-Kontrolle; * $p < 0,05$ vs. Tumorkontrolle.

4.2.4. Einfluss der Antitumorthherapie auf hämatologische Parameter

Die systemische Leukozyten- und Thrombozytenzahl lag in den Tumorkontrolltieren und den Vehikel-behandelten Kontrolltieren um $4 \times 10^9/L$ bzw. $700 \times 10^9/L$. Nach Injektion des M49wt konnte eine massive, transiente Leuko- und Thrombozytose beobachtet werden (Abb. 22A, B). Die Applikation der SLS μ , sowie des Lysates induzierten dahingegen nur einen marginalen Anstieg der Leukozyten, die Anzahl der Thrombozyten veränderte sich zunächst nicht. Im weiteren Verlauf kam es jedoch zu einer Abnahme der Thrombozytenwerte. Der Hämatokrit nahm bei Tieren, denen vitale Bakterien injiziert wurden, im Zeitverlauf sukzessive ab und zeigte signifikante Veränderungen ab Tag 14 nach Therapiebeginn (Abb. 22C). Demgegenüber ergab die Analyse bei Lysat-behandelten Tieren keine Veränderung des Hämatokrit, er lag zu allen Untersuchungszeitpunkten im physiologischen Bereich (Abb. 22C).

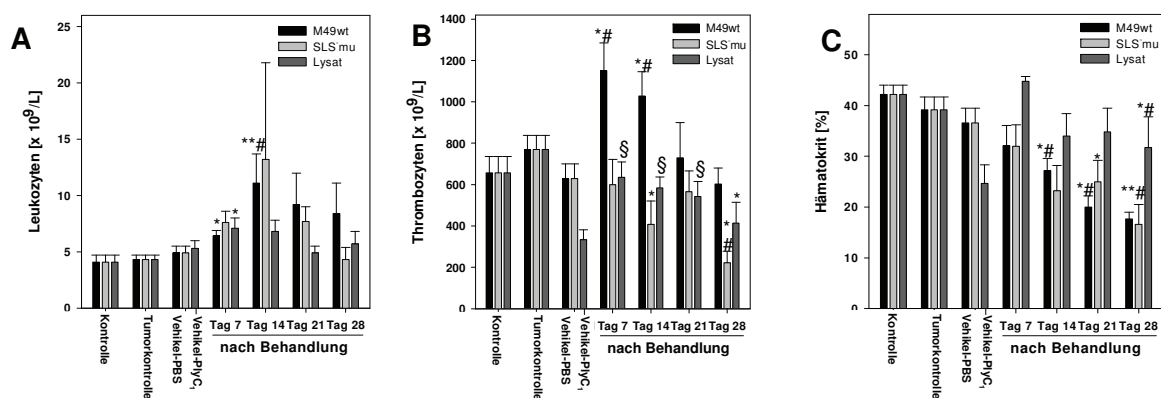


Abb. 22: Anteil der (A) Leuko- und (B) Thrombozyten sowie der (C) Hämatokrit im peripheren Blut von Tieren mit einem etablierten *s. c. Panc02*-Tumor, die entweder mit *S. pyogenes* Serotyp M49wt, der SLS μ oder dem Lysat behandelt wurden (je $n=7$ pro Zeitpunkt) bzw. äquivalente Volumina der Vehikellösung erhielten (je $n=12$). Tiere ohne i. t. Injektion dienten als Tumorkontrolltiere ($n=12$). Physiologische Werte wurden von unbehandelten Kontrolltieren ($n=3$) erhalten. Angegeben sind der MW \pm SEM. Mann-Whitney U-Test: * $p<0,05$ vs. Tumorkontrolle, ** $p<0,001$ vs. Tumorkontrolle, # $p<0,05$ vs. Vehikel-PBS, § $p<0,05$ vs. Vehikel-PlyC₁.

Weiterhin zeigte sich, dass die einzelnen Therapieschemata Einfluss auf das Differentialblutbild haben. Nach M49wt Behandlung kam es gegenüber den Kontrolltieren zu einer kontinuierlichen Abnahme der peripheren Lymphozyten (Tag 28: $42,7 \pm 10,5$ % vs. Vehikel-PBS $71,8 \pm 4,0$ %), aber zu einer Zunahme des Anteils segmentförmiger, neutrophiler Granulozyten (Tag 28: $51,0 \pm 11,7$ % vs. Vehikel-PBS $23,0 \pm 3,8$ %). Alle anderen Leukozytensubpopulationen zeigten keine wesentlichen Veränderungen. Der im Blutbild erhobene Anstieg der Leukozyten ist demzufolge vorrangig auf eine Granulozytose zurückzuführen. Vergleichbare Werte wurden nach SLS μ Applikation erhoben, welche auf einen postakuten proinflammatorischen Stimulus nach bakterieller Infektion schließen lassen. Demgemäß führte die Injektion des Lysates nur zu einer marginalen Veränderung im Differentialblutbild. Der Anteil peripherer Blutlymphozyten war zu allen Untersuchungszeitpunkten mit ca. 65 % auf Kontrollniveau. Ebenso bestanden keine Unterschiede im Anteil der Granulozyten zwischen Kontroll- und Lysat-behandelten Tieren.

In begleitenden Untersuchungen zur systemischen Ausbreitung von *S. pyogenes*, wurden Homogenate von der Leber und der Lunge zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion gewonnen und zur Bakterientiterbestimmung auf Blutagarplatten ausplattiert. Parallel dazu erfolgte der Ausstrich von Blutproben. Bei Tieren, deren Allgemeinzustand keinen Hinweis auf einen systemischen Infektionsverlauf gab, konnten keine vitalen Bakterien in den Organen und dem Blut nachgewiesen werden. Dies gilt sowohl für die Tiere, denen der *S. pyogenes* M49wt appliziert wurde, als auch für Tiere, die eine i. t. Injektion der SLS^{mu} erhielten. Dagegen wurden in zwei der mit dem M49wt i. t. infizierten Tiere vitale Bakterien in Leber, Lunge und im Blut detektiert. Die Bakterientiter lagen am Tag 7 nach Infektion über 10^6 *S. pyogenes* M49wt im Blut bzw. über 10^5 Streptokokken in Leber und Lunge. Diese Tiere hatten entsprechende Anzeichen einer systemischen Infektion (Gewichtsverlust, Lethargie, Anämie) und wurden vorzeitig aus dem Versuch genommen.

Die Ergebnisse zeigen somit, dass die lokale Gabe von Bakterien in der beschriebenen Dosis prinzipiell nicht zu einem systemischen Infektionsverlauf führt. Sie zeigen jedoch auch, dass eine systemische Dissemination von *S. pyogenes*, welche vermutlich auf eine ineffektive Bekämpfung der Bakterien in der frühen postakuten Phase zurückzuführen ist, entscheidend zur Verschlechterung des Allgemeinzustandes beiträgt und dadurch letal ist.

4.2.5. Untersuchung des Einflusses der Immuntherapie auf spezifische Enzyme im Plasma zur Beurteilung einer potentiellen Gewebsschädigung

Um abschließend beurteilen zu können, ob durch die Therapieschemata eine Organschädigung verursacht wurde, erfolgte zusätzlich die Analyse von Enzymen im Plasma. Dabei wurden die Aktivitäten der Aminotransferasen ASAT und ALAT, sowie der LDH bestimmt. Normalerweise findet man nur eine geringe Aktivität dieser Enzyme im Blut. Werden Leberzellen geschädigt oder gehen zu Grunde, steigt die Aktivität im Blut stark an. LDH zeigt als klinischer Laborparameter ebenfalls eine Schädigung an. Da die LDH jedoch in allen Geweben vorkommt, kann man bei einem erhöhten LDH-Wert nur schließen, dass an unbekannter Lokalisation eine Gewebeschädigung aufgetreten ist.

In Korrelation zu den makroskopischen Befunden der inneren Organe, ergab die Bestimmung der Leberenzymaktivitäten allerdings ebenfalls keinen Hinweis auf eine Schädigung. Bei allen Therapiegruppen wurden nahezu physiologische Aminotransferasenwerte gemessen (Abb. 23A, B). Demgegenüber wurden Unterschiede in der Aktivität der LDH im Plasma nachgewiesen. Die Behandlung mit dem M49wt und dem Lysat führte auch am Tag 28 gegenüber gesunden Kontrolltieren lediglich zu einem marginalen Anstieg der LDH-Aktivität und bestätigte damit vorangegangene Ergebnisse (Abb. 23C). Durch die SLS^{mu} Infektion wurde jedoch ein ab Tag 14, den tumortragenden Kontrolltieren vergleichbar erhöhter LDH-Wert gemessen, der vermutlich auf die Tumorlast zurückzuführen ist und auf einen vermehrten Zerfall von Zellen hindeutet.

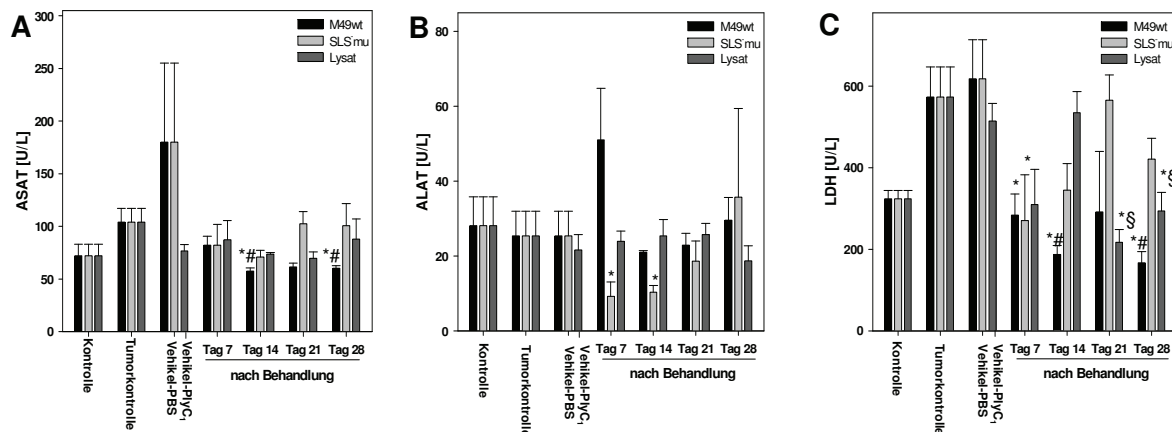


Abb. 23: Enzymaktivität von (A) ASAT, (B) ALAT und (C) LDH im Plasma von Tieren mit einem etablierten *s. c.* Panc02-Tumor, die entweder mit *S. pyogenes* Serotyp M49wt, der SLS mu oder dem Lysat behandelt wurden (je $n=7$ pro Zeitpunkt) bzw. äquivalente Volumina der Vehikellösung erhielten (je $n=12$). Tiere ohne *i. t.* Injektion dienten als Tumorkontrolltiere ($n=12$). Physiologische Werte wurden von unbehandelten Kontrolltieren ($n=3$) erhalten. Angegeben sind der MW \pm SEM. Mann-Whitney U-Test: * $p<0,05$ vs. Tumorkontrolle, # $p<0,05$ vs. Vehikel-PBS, \$ $p<0,05$ vs. Vehikel-PlyC₁.

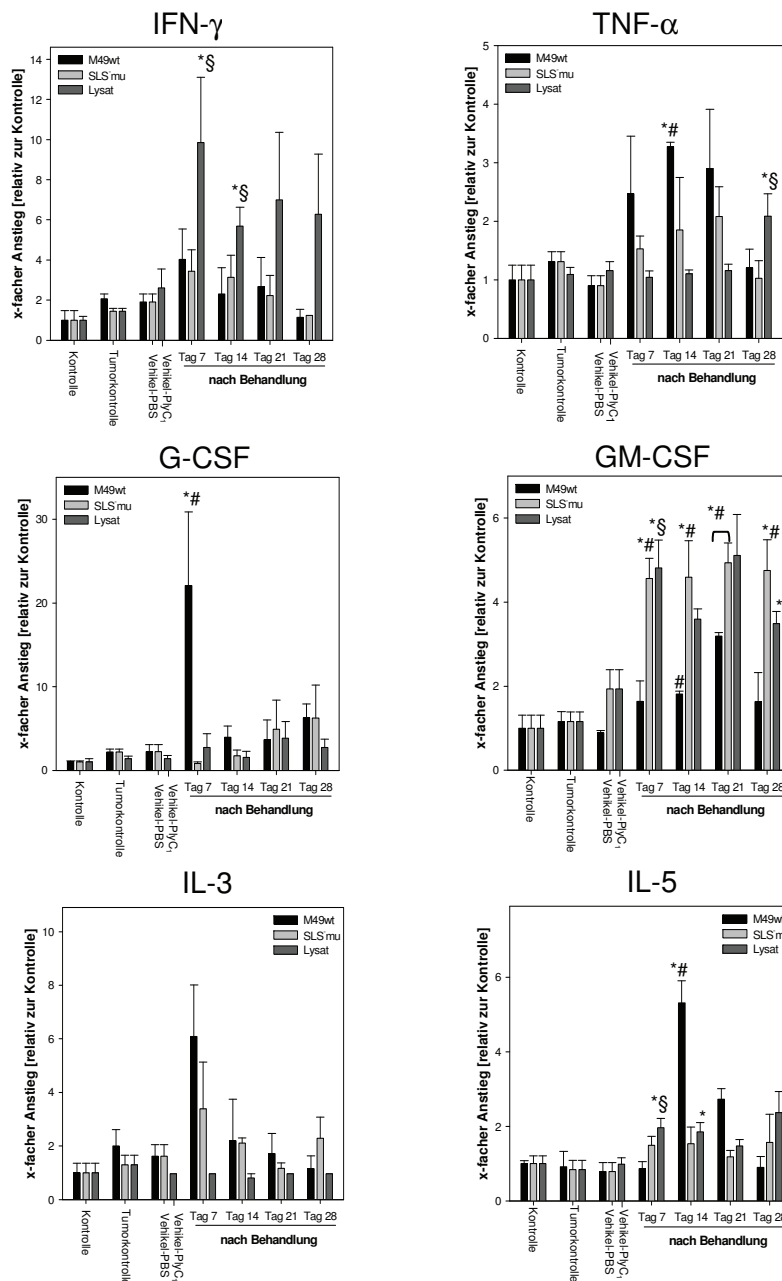
4.2.6. Nachweis von proinflammatorischen Th₁/Th₂-Zytokinen im Plasma nach therapeutischer Intervention

Die Mechanismen der durch *S. pyogenes* vermittelten Tumorstillungsbeeinflussung sind vermutlich auf auch eine Aktivierung des Immunsystems zurückzuführen. Erste Hinweise auf eine immunologische Beteiligung können proinflammatorische Zytokine im Plasma geben. Entsprechend erfolgte in diesen Untersuchungen die Bestimmung von IL-3, IL-5, IL-6, IL-10, G-CSF, GM-CSF, TNF- α und IFN- γ , dessen Ergebnisse sind in Abb. 24 zusammengefasst.

Die bakteriolytische Therapie mit dem M49wt führte zu einer transienten, aber massiven Zunahme der proinflammatorischen Th₁-Zytokine G-CSF, TNF- α , IFN- γ und IL-3, welche von T-Zellen im Rahmen ihres Aktivierungsprozesses sezerniert werden. Am Tag 14 nach Infektion kam es zusätzlich zu einem 7- bzw. 15-fachen Anstieg der Th₂-Zytokine IL-5 und IL-6. Zu späteren Zeitpunkten wurde dann vermehrt GM-CSF im Plasma nachgewiesen, welches für die Rekrutierung und Reifung von Lymphozyten verantwortlich ist und damit zur Aufrechterhaltung der Immunantwort beiträgt. Die Behandlung mit dem Lysat führte zu etwas anderen Ergebnissen, wobei die Th₁-gerichtete Zytokinantwort dominierte. Besonders auffällig war die deutliche und über den gesamten Beobachtungszeitraum konstant erhöhte IFN- γ Konzentration im Plasma, sowie eine kontinuierliche Zunahme des von Makrophagen, APC und NK-Zellen sezernierten proinflammatorischen TNF- α , wodurch antitumorale Immunantworten verstärkt werden können. Korrelierend kam es auch insbesondere zu späteren Zeitpunkten nach Therapie zu einer Zunahme von G-CSF und GM-CSF im Plasma. Die Th₂-Zytokine IL-5 und IL-6 wurden dagegen nur transient vermehrt detektiert. Dies gilt in adäquater Weise für IL-10, dessen Konzentration generell in den tumortragenden Tieren etwas hö-

her war (ca. 2fach), als in naiven Kontrolltieren und auf eine leichte, tumor-bedingte Immunsuppression hindeutet.

Entsprechend der geringen antitumoralen Effekte der SLS^{mu} *in vivo*, bestätigten auch die Zytokinprofile nur eine geringe, und gegenüber den anderen beiden Therapieschemata zeitlich verzögerte Immunstimulierung. In der postakuten Phase, an den Tagen 7 und 14 kam es zu einer leichten Zunahme an sezerniertem IL-3, IL-6 und IFN- γ . Im weiteren Verlauf wurden dann auch die Th₁-Zytokine G-CSF und GM-CSF, sowie TNF- α erhöht nachgewiesen, die aber nur zu einer marginalen Beeinflussung des Tumorwachstums *in vivo* beitragen konnten (s. 4.2.2.). Diese Befunde zeigen damit, dass eine frühe und starke Aktivierung des Immunsystems notwendig ist, um das Tumorwachstum *in vivo* hemmen zu können.



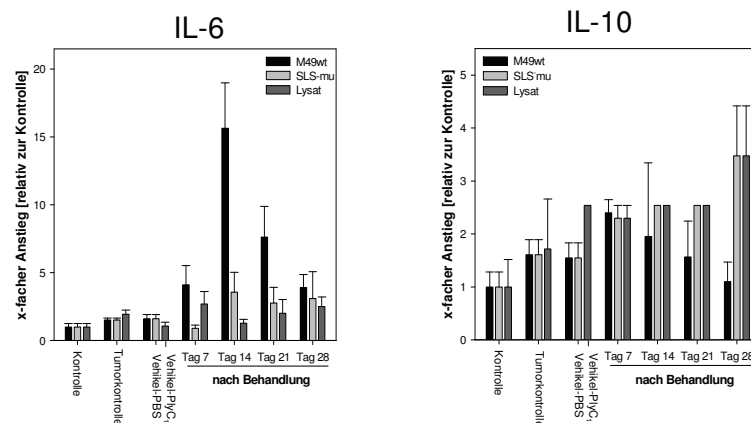


Abb. 24: Th_1/Th_2 Zytokinprofile im Plasma von Tieren mit einem etablierten s. c. Panc02-Tumor, die entweder mit *S. pyogenes* Serotyp M49wt, der SLS mu oder dem Lysat behandelt wurden (je $n=7$ pro Zeitpunkt) bzw. äquivalente Volumina der Vehikellösung erhielten (je $n=12$). Tiere ohne i. t. Injektion dienten als Tumorkontrolltiere ($n=12$). Physiologische Werte wurden von unbehandelten Kontrolltieren ($n=3$) erhalten. Die Daten sind als relativer Anstieg im Verhältnis zu unbehandelten Kontrolltieren angegeben, welche eins gesetzt wurden. Angegeben sind der MW \pm SEM. Mann-Whitney U-Test: * $p<0,05$ vs. Tumorkontrolle, # $p<0,05$ vs. Vehikel-PBS, § $p<0,05$ vs. Vehikel-PlyC₁.

4.2.7. Zusammenfassung

Die tierexperimentellen Untersuchungen zum Nachweis des therapeutischen Potentials von *S. pyogenes* in Panc02-tumortragenden Tieren ergaben, dass

- Bakterien des Stammes *S. pyogenes* prinzipiell antitumoral wirksam sind, der Verlust des zytolytischen Toxins SLS den therapeutischen Effekt allerdings fast vollständig aufhebt.
- ein bakterielles Lysat von *S. pyogenes* M49wt ein ähnliches antitumorales Potential besitzt wie das vitale Bakterium.
- durch die Behandlung mit *S. pyogenes* proinflammatorische Th_1 und Th_2 Zytokine produziert werden, welche die Generierung tumorreaktiver immunologischer Effektorzellen triggern, die dann zur Wachstumsverzögerung der Tumoren beitragen können.

4.3. Immunologischer Nachweis der therapeutischen Wirksamkeit von *S. pyogenes*

Aus den vorangegangenen Untersuchungen ergab sich die Frage, inwiefern die beobachteten antitumoralen Effekte auch auf immunologische Mechanismen zurückzuführen sind und ob durch die Therapieregime spezifisch immunologische Effektorzellen generiert werden. Um dies zu beantworten, erfolgte zunächst die phänotypische Charakterisierung peripherer Blutleukozyten und Splenozyten mittels Durchflusszytometrie.

4.3.1. Immunophänotypisierung der Lymphozytensubpopulationen im peripheren Blut und in der Milz mittels Durchflusszytometrie

In Korrelation mit dem beobachteten antitumoralen Effekt *in vivo*, sowie den erhobenen Zytokinprofilen, zeigte sich, dass sowohl der M49wt, als auch das Lysat eine starke proinflammatorische systemische Immunreaktion auslösen (Abb. 25). In beiden Therapiegruppen wurden auch nach längerer Zeit signifikant vermehrt CD11b-positive Monozyten und Granulozyten im peripheren Blut detektiert, die jedoch nach bakteriolytischer Therapie mit dem M49wt am stärksten ausgeprägt war (Abb. 25). Außerdem kam es zu einer kontinuierlichen Zunahme an zirkulierenden NK-Zellen, welche am Tag 28 nach Therapiebeginn mit 40 % (M49wt) bzw. 42 % (Lysat) gegenüber Kontrolltieren (17 %) deutlich erhöht waren. Diese Zellen besitzen neben der Fähigkeit Zielzellen direkt zu lysieren zusätzlich das Potential, nach Aktivierung als Effektorzellen spezifische Abwehrmechanismen zu induzieren und schließlich antitumorale Effekte zu verstärken.

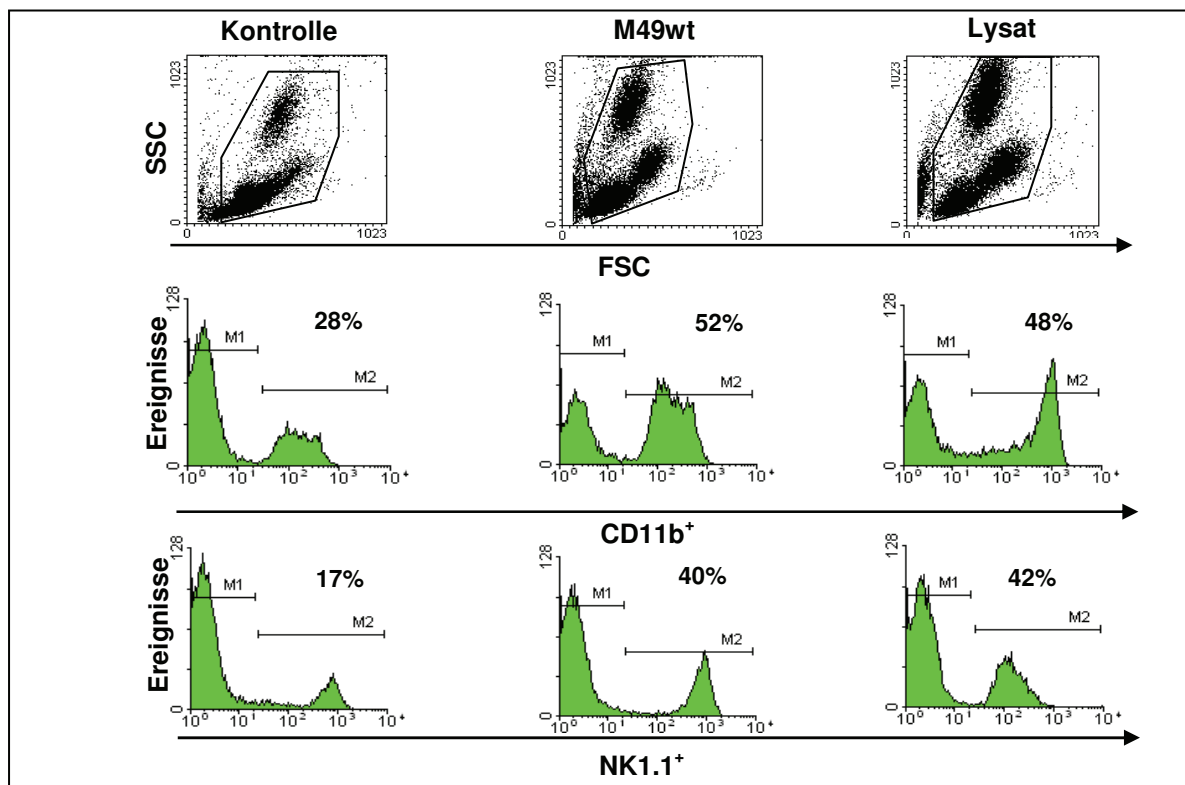


Abb. 25: Repräsentative durchflusszytometrische Darstellung von peripheren Blutleukozyten tumortragender Tiere zum Zeitpunkt 28 Tage, die entweder mit *S. pyogenes* Serotyp M49wt oder dem Lysat behandelt wurden (je $n=7$). Die in dieser Abbildung aufgeführte Kontrolle ist repräsentativ für alle Kontrollgruppen. In der FSC/SSC Darstellung sind deutlich die unterschiedlichen Leukozytensubpopulationen erkennbar. Die Kontrolltiere zeigen ein unauffälliges Bild, mit einem geringen granulozytären und monozytären Anteil. Nach der Behandlung kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Granulozyten- und Monozytenpopulation, welche mit erhöhtem Anteil an CD11b⁺ und NK1.1⁺ Zellen korreliert.

Demgegenüber wurden keine Unterschiede im Expressionsmuster der T-Zellen beobachtet. Der Anteil an zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Helferzellen war zu allen Unter-

suchungszeitpunkten zwischen den Behandlungsgruppen vergleichbar. Dies gilt in ähnlicher Weise für die B-Zellen, deren Anteil zwischen 30-40 % lag.

In parallelen Untersuchungen wurden Lymphozyten der Milz charakterisiert. Tiere, die mit dem M49wt behandelt wurden, zeigten insbesondere in der postakuten Phase eine deutliche Zunahme von Zellen der nicht-adaptiven Immunabwehr in der Milz. Makrophagen, Monozyten und reife Granulozyten (CD11b⁺, Gr1⁺) wurden innerhalb der ersten 14 Tage nach *S. pyogenes* Infektion vornehmlich nachgewiesen (Abb. 26). Demgegenüber waren nach Lysatbehandlung nur marginal mehr CD11b bzw. Gr1-positive Zellen in der Milz vorhanden, als in den Kontrolltieren. Allerdings kam es, wie bereits im Blut beobachtet, zu einer kontinuierlichen Zunahme von NK-Zellen (Abb. 26).

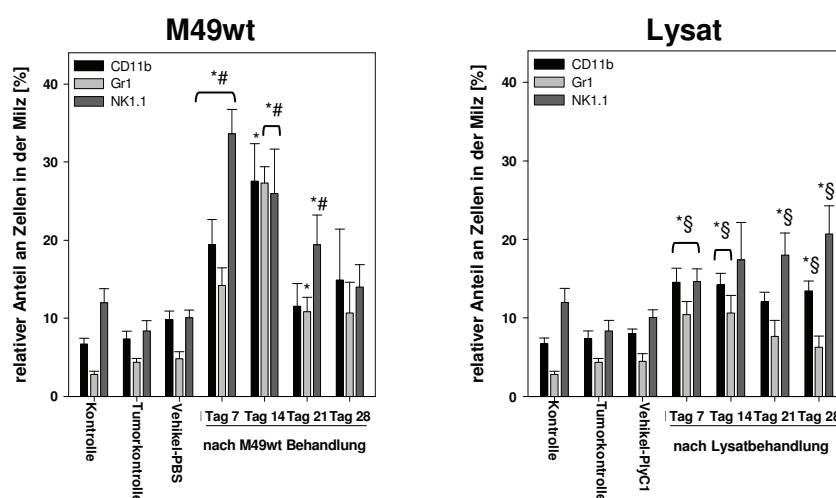


Abb. 26: Quantitative Analyse zur durchflusszytometrischen Untersuchung des relativen Anteils CD11b-, Gr1- und NK1.1-positiver Leukozyten in der Milz von Tieren mit einem etablierten *s. c.* Panc02-Tumor, die entweder mit *S. pyogenes* Serotyp M49wt oder dem Lysat behandelt wurden (je $n=7$ pro Zeitpunkt) bzw. äquivalente Volumina der Vehikellösung erhielten (je $n=12$). Tiere ohne i. t. Injektion dienten als Tumorkontrolltiere ($n=12$). Physiologische Werte wurden von unbehandelten Kontrolltieren erhalten ($n=3$). Angegeben sind der MW \pm SEM. Mann-Whitney U-Test: * $p<0,05$ vs. Tumorkontrolle, # $p<0,05$ vs. Vehikel-PBS, \$ $p<0,05$ vs. Vehikel-PlyC1.

Bei einem Teil der NK1.1-positiven Zellen wurde simultan CD11c (DC Marker) auf der Oberfläche nachgewiesen. Dies deutet darauf hin, dass durch die Therapie mit dem M49wt und dem Lysat vermehrt Natural killer dendritic cells (NKDC) in der Milz vorhanden sind. Diese Subpopulation von DCs besitzt Eigenschaften von NK-Zellen (NK1.1⁺) und agiert als Vermittler zwischen nicht-adaptiver und adaptiver Immunität (134). Der Anteil an NKDCs stieg initial nach bakteriolytischer M49wt- auf $2,2 \pm 0,4$ % und auf $3,5 \pm 0,7$ % nach Lysatbehandlung und blieb bis zum Tag 28 nach Therapiebeginn gegenüber nicht-therapierten Tieren erhöht (Abb. 27). Darüber hinaus zeigten die Untersuchungen, dass einige NK1.1⁺ Zellen neben CD11c, ebenfalls CD45R auf der Oberfläche tragen. CD11c⁺ NK1.1⁺ CD45R⁺ Zellen, gehören zu den NKDCs und besitzen vergleichbare antitumorale Eigenschaften. Diese Zellen werden, entsprechend ihrer Fähigkeit, große Mengen an IFN- γ sezernieren, als

Interferon-gamma producing killer dendritic cells (IKDC) bezeichnet, die verschiedene Immunprozesse stimulieren können (135). IKDC wurden insbesondere am Tag 7 nach M49wt- und Lysatbehandlung in erhöhter Menge in der Milz nachgewiesen (Abb. 28). Dieser Anstieg korrelierte mit einer Zunahme von proinflammatorischem IFN- γ im Plasma (s. 4.2.6.).

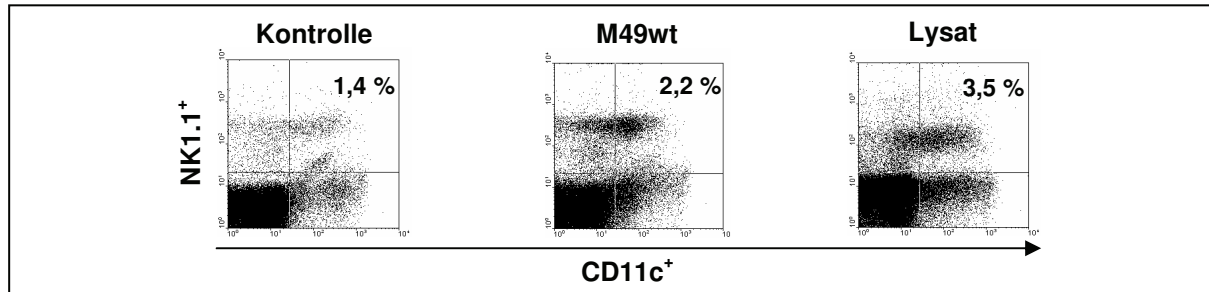


Abb. 27: Repräsentative durchflusszytometrische Darstellung von $CD11c^+$ $NK1.1^+$ NKDCs in der Milz tumortragender Tiere zum Zeitpunkt 7 Tage, die entweder mit *S. pyogenes* Serotyp M49wt oder dem Lysat behandelt wurden ($n=6$). Die in dieser Abbildung aufgeführte Kontrolle ist repräsentativ für alle Kontrollgruppen.

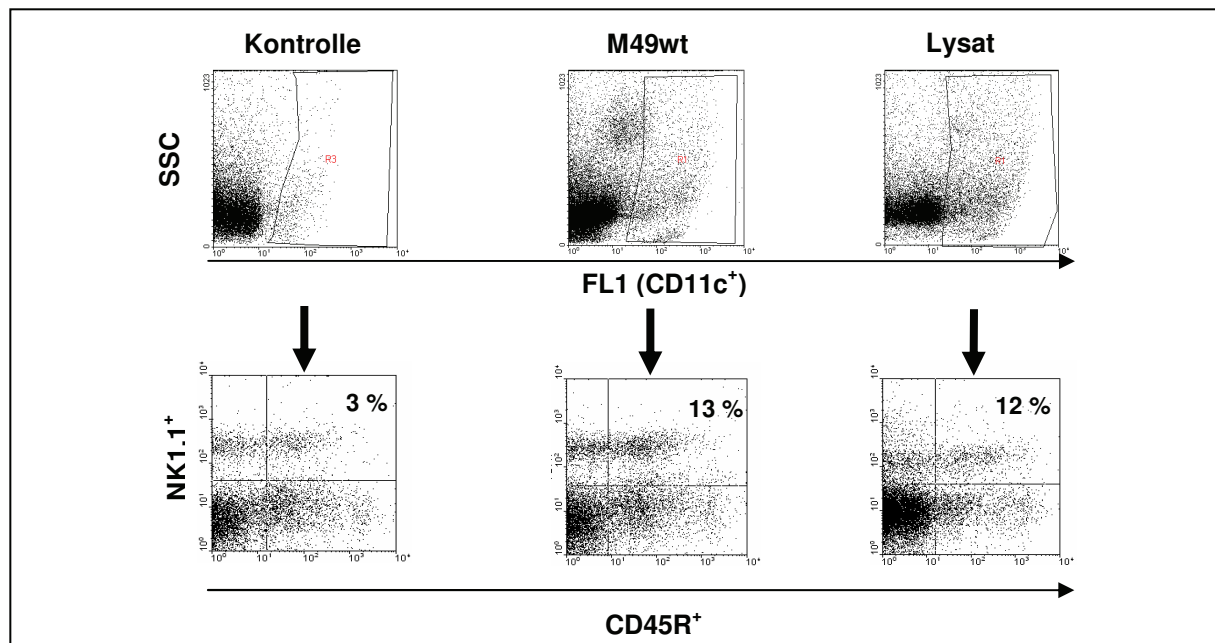


Abb. 28: Repräsentative durchflusszytometrische Analyse von IKDCs in der Milz tumortragender Tiere zum Zeitpunkt 7 Tage, die entweder mit *S. pyogenes* Serotyp M49wt oder dem Lysat behandelt wurden ($n=6$). Die in dieser Abbildung aufgeführte Kontrolle ist repräsentativ für alle Kontrollgruppen. In der FL1/SSC-Darstellung sind die $CD11c^+$ Zellen erkennbar. Um diese Zellpopulation wurde ein elektronisches „Gate“ gelegt (oberer Teil). Für die Darstellung der $CD45R^+$ $NK1.1^+$ -Zellen wurde dieses „Gate“ aktiviert, woraus der Anteil $CD11c^+$ $NK1.1^+$ $CD45R^+$ Zellen resultiert (unterer Teil).

Parallel wurden sowohl nach M49wt- als auch nach Lysatbehandlung vermehrt aktivierte Zellen ($CD80^+$, $CD86^+$) in der Milz detektiert (Abb. 29A), was die allgemeine systemische Immunstimulierung nach bakteriolytischer Therapie aufgezeigt. Die stetige Zunahme des Transferrinrezeptors CD71, welche exklusiv in Splenozyten von M49wt-therapierten Tieren erfasst wurde, ist ferner auf einen körpereigenen antibakteriellen Abwehrmechanismus

zurückzuführen. Durch die erhöhte Zahl an CD71 Rezeptoren auf der Zelloberfläche ist das Eisenangebot für *S. pyogenes* reduziert, wodurch die bakterielle Infektion kontrolliert wird (Abb. 29A). Am Tag 28 nach M49wt Infektion wurde bei über 80 % der Zellen der Transferinrezeptor nachgewiesen. Gleichzeitig kam es zu einer deutlichen Abnahme der CD4⁺- und CD8⁺- Zellpopulationen in der Milz (Abb. 29B), was auf die Migration der Zellen in lymphoide Organe hindeutet. L-Selektin, welches auf naiven T-Zellen exprimiert wird, wurde ebenfalls stetig herunterreguliert. Die Behandlung mit dem Lysat zeigte ein konträres Bild mit initial signifikanter Induktion von L-Selektin, sowie einer transienten, leichten Zunahme der T-Zellen (Abb. 29B).

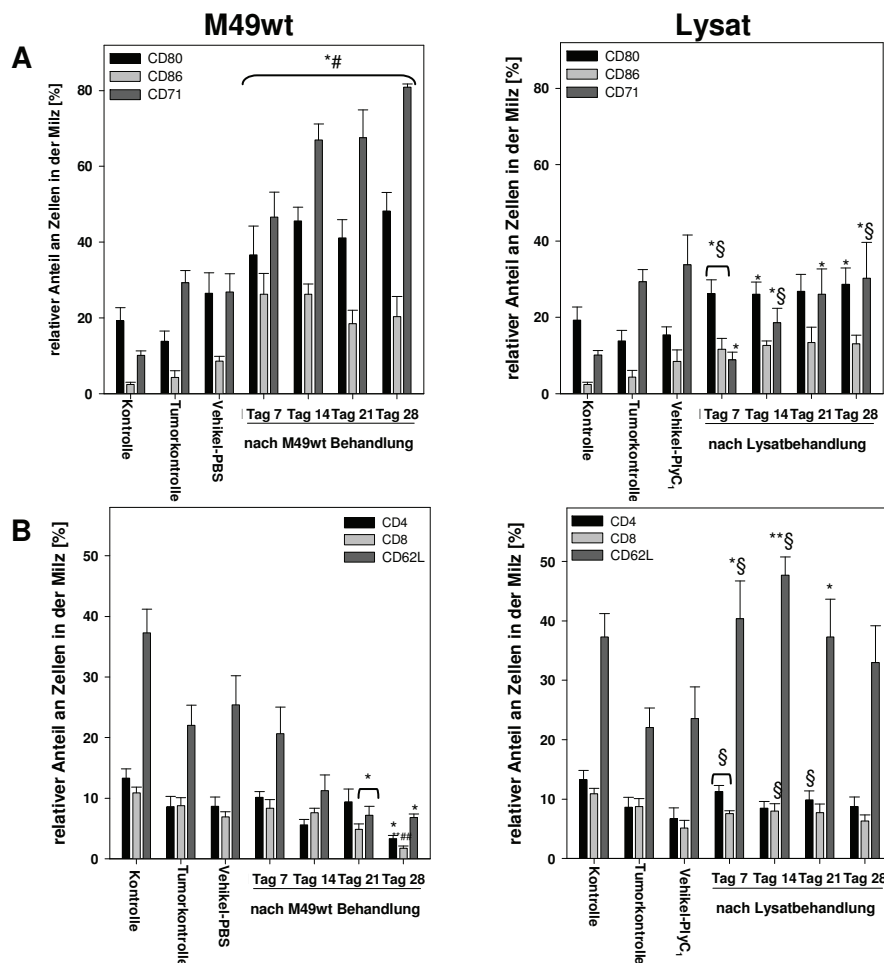


Abb. 29: Quantitative Analyse zur durchflusszytometrischen Untersuchung des relativen Anteils (A) CD80-, CD86- und CD71-positiver Leukozyten bzw. (B) CD4-, CD8- und CD62L-positiver Leukozyten in der Milz von Tieren mit einem etablierten s. c. Panc02-Tumor, die entweder mit *S. pyogenes* Serotyp M49wt oder dem Lysat behandelt wurden (je $n=7$ pro Zeitpunkt) bzw. äquivalente Volumina der Vehikellösung erhielten (je $n=12$). Tiere ohne i. t. Injektion dienten als Tumorkontrolltiere ($n=12$). Physiologische Werte wurden von unbehandelten Kontrolltieren erhalten ($n=3$). Angegeben sind der MW \pm SEM. Mann-Whitney U-Test: * $p<0,05$ vs. Tumorkontrolle, ** $p<0,001$ vs. Tumorkontrolle; # $p<0,05$ vs. Vehikel-PBS, ## $p<0,001$ vs. Vehikel-PBS, § $p<0,05$ vs. Vehikel-PlyC₁.

Ebenso induzierte die Lysatbehandlung einen massiven Anstieg der CD19⁺- und CD40⁺- Zellfraktion auf 49 % bzw. 62 % am Tag 7 ($p<0,05$ bzw. $p<0,001$ vs. Vehikel-PlyC₁), sowie

eine kontinuierlich vermehrte Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM (CD54), welcher als wichtiger Mediator der zellulären Migration agiert und auch auf NK-Zellen zu finden ist. Die Applikation von M49 führte ebenfalls zur Heraufregulation von CD54, interessanterweise kam es allerdings neben der Auswanderung von T-Zellen zusätzlich zu einer kontinuierlichen Abnahme CD19⁺-B-Zellen in der Milz (Abb. 30).

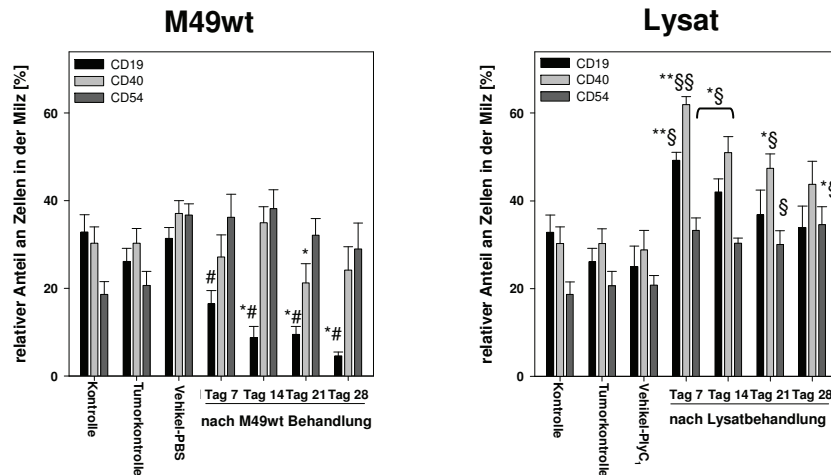


Abb. 30: Quantitative Analyse zur durchflusszytometrischen Untersuchung des relativen Anteils CD19-, CD40- und CD54-positiver Leukozyten in der Milz von Tieren mit einem etablierten s. c. Panc02-Tumor, die entweder mit *S. pyogenes* Serotyp M49wt oder dem Lysat behandelt wurden (je $n=7$ pro Zeitpunkt) bzw. äquivalente Volumina der Vehikellösung erhielten (je $n=12$). Tiere ohne i. t. Injektion dienten als Tumorkontrolltiere ($n=12$). Physiologische Werte wurden von unbehandelten Kontrolltieren erhalten ($n=3$). Angegeben sind der MW \pm SEM. Mann-Whitney U-Test: * $p<0,05$ vs. Tumorkontrolle, ** $p<0,001$ vs. Tumorkontrolle, # $p<0,05$ vs. Vehikel-PBS, \$ $p<0,05$ vs. Vehikel-PlyC₁, \$\$ $p<0,001$ vs. Vehikel-PlyC₁.

4.3.3. Einfluss der Antitumorthherapie auf regulatorische T-Zellen

Verschiedene Daten aus der Literatur weisen darauf hin, dass T_{reg}, welche antitumorale Immunantworten supprimieren, vermehrt in Panc02-tumortragenden Mäusen vorkommen (61). Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurden CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ Zellen im peripheren Blut nachgewiesen. Es zeigte sich, dass die Anzahl der Zellen im Blut nach Tumorinduktion nicht erhöht ist. Bei gesunden, tumorfreien Tieren beträgt der Anteil an T_{reg} ca. 2,5 % der Lymphozyten, nach Induktion s. c. Panc02-Tumoren wurden bei $2,1 \pm 0,3$ % der Zellen die Oberflächenmarker CD4 und CD25 simultan detektiert. Innerhalb dieser Zellpopulation waren ca. 70 % ebenfalls Foxp3 positiv (Abb. 31A). Die Behandlung mit dem M49wt, sowie dem Lysat führte überdies zunächst zu keiner Veränderung der T_{reg}. Am Tag 28 kam es jedoch in beiden Therapiegruppen zu einer Reduktion der Anzahl CD4⁺ CD25⁺ Zellen (Abb. 31A). Parallel dazu nahm der Anteil Foxp3⁺ Zellen der CD4⁺ CD25⁺ Zellfraktion deutlich ab (Abb. 31B). Eine eindeutige Korrelation zwischen dem Vorkommen von T_{reg} im Blut und der Tumorlast bzw. dem Therapieerfolg konnte innerhalb der Versuchsreihen jedoch nicht beobachtet werden.

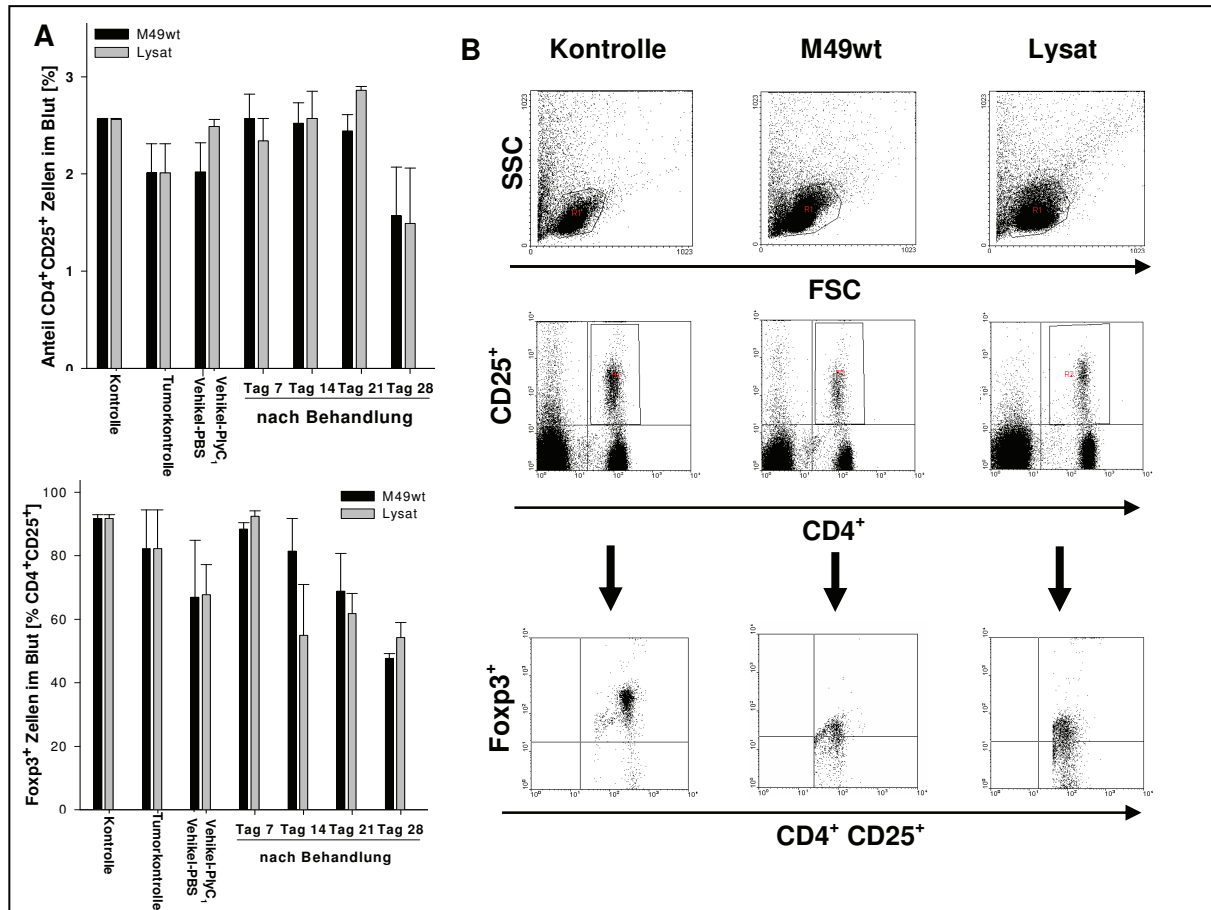


Abb. 31: Durchflusszytometrische Untersuchung von im peripheren Blut. (A) Quantitative Analyse $CD4^+CD25^+$ und Foxp3⁺ Zellen von Tieren mit einem etablierten s. c. Panc02-Tumor, die entweder mit *S. pyogenes* Serotyp M49wt oder dem Lysat behandelt wurden (je $n=3$ pro Zeitpunkt) bzw. äquivalente Volumina der Vehikellösung erhielten (je $n=12$). Tiere ohne i. t. Injektion dienten als Tumorkontrolltiere ($n=12$). Physiologische Werte wurden von unbehandelten Kontrolltieren erhalten ($n=3$). Angegeben sind der MW \pm SEM. (B) In der FSC/SSC-Darstellung sind die Lymphozyten nach Dichtegradientenzentrifugation erkennbar (Zeitpunkt 28 Tage). Um diese Zellpopulation wurde ein elektronisches „Gate“ gelegt (oberer Teil). Für die Darstellung der $CD4^+CD25^+$ -Zellen wurde dieses „Gate“ aktiviert, woraus der Anteil $CD4^+CD25^+$ Zellen resultiert (mittlerer Teil). Die Darstellung Foxp3⁺ Zellen erfolgte, indem ein weiteres elektronisches „Gate“ um die $CD4^+CD25^+$ Zellpopulation gelegt und nachfolgend aktiviert wurde (unterer Teil). Ein repräsentatives Experiment ist dargestellt.

4.3.3. Nachweis der IFN- γ Sekretion aus Lymphozyten infolge der Kultivierung mit syngenem Zielzellen

Zur *ex vivo* Untersuchung der Spezifität der antitumoralen Immunantwort wurde die antigen-induzierte Freisetzung von IFN- γ aus Milzlymphozyten (Th₁- und NK-Zellen) nach über Nacht Kokultivierung mit syngenem malignen (Panc02, EL4, CMT-93) und nicht-malignen Zellen (MC3T3-E1, PBMC) mittels ELISpot in einem Effektor zu Target Verhältnis von 10:1 bestimmt.

Diese Untersuchungen ergaben, dass alle syngenem Tumorzellen, also neben Panc02, auch EL4 (Lymphom) und CMT-93 (Rektumkarzinom) zeitabhängig die Freisetzung von IFN- γ aus Lymphozyten M49wt-therapierter Tiere triggerten (Abb. 32A). In der frühen postakuten Phase nach bakteriolytischer Therapie wurde eine Zunahme der Spot-Anzahl um mehr als den Faktor zwei detektiert. Entsprechend des reduzierten Anteils CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Milz zu späteren Untersuchungszeitpunkten wurden am Tag 28 nur wenige IFN- γ sezernierende Lymphozyten nachgewiesen (Abb. 32A). Die Reaktivität der Splenozyten gegen verschiedene Tumorentitäten lässt ferner darauf schließen, dass die syngenem Tumorzellen Panc02, EL4 und CMT-93 gleiche Zielstrukturen tragen, die von Lymphozyten erkannt werden. Entsprechend vermittelten die Kontrollzellen (MC3T3-E1, PBMC) keine T-Zellantwort (Abb. 32B). Die Spezifität der antitumoralen Immunantwort wurde darüber hinaus durch die fehlende IFN- γ Freisetzung aus Lymphozyten von Kontrolltieren belegt.

Die Lysatbehandlung führte ebenfalls zu einer deutlichen Zunahme der Anzahl IFN- γ produzierender Zellen, welche gegenüber Panc02 Zellen an den Tagen 7 und 14 signifikant erhöht war ($p < 0,05$ vs. Tumorkontrolle). Darüber hinaus zeigte sich, dass die syngenem Tumorzellen EL4 und CMT-93 -wie bereits nach M49wt Behandlung- die Sekretion von IFN- γ aus Lymphozyten vermitteln (Abb. 32C), wodurch belegt werden konnte, dass die immunologischen Effektorzellen eine breite Tumorreaktivität aufweisen. Die Spezifität der Reaktion wurde ferner dadurch bestätigt, dass Kontrollzellen keine Zytokinfreisetzung triggerten (Abb. 32D). Überdies wurden nach Kokultur von Lymphozyten nicht-therapierter Kontrolltiere keine Unterschiede in der Anzahl der IFN- γ -Spots nachgewiesen.

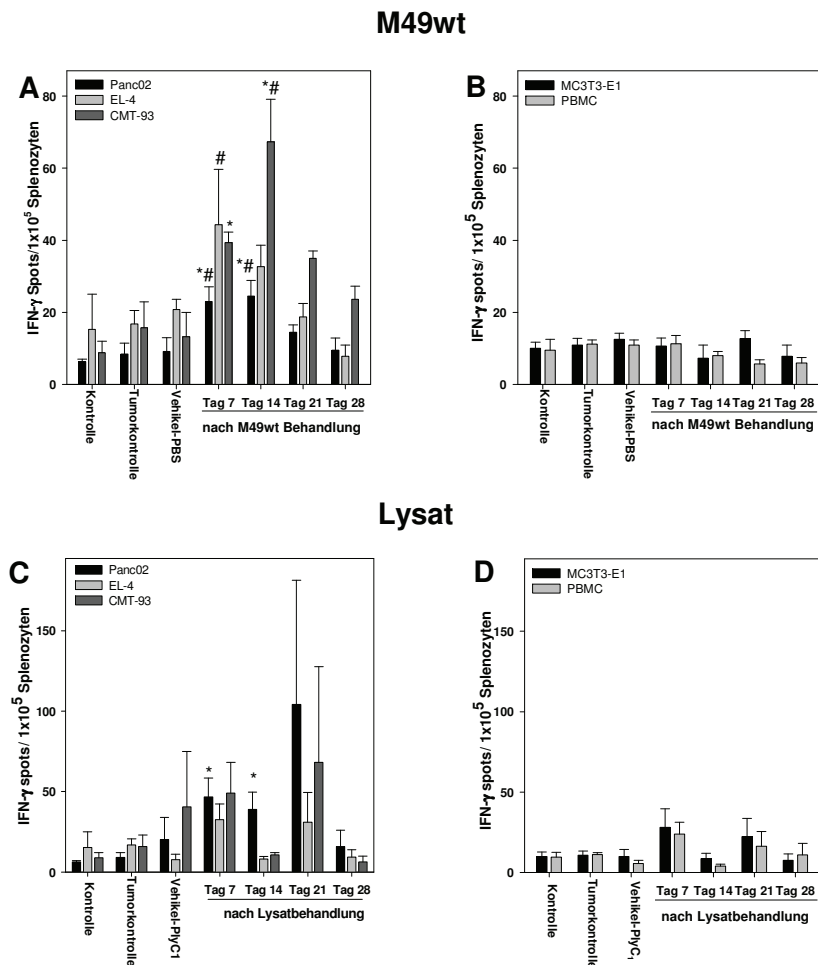


Abb. 32: IFN- γ ELISpot sezernierender T-Zellen der Milz nach Kokultur mit malignen Panc02, EL4 und CMT-93 Zellen bzw. nicht-malignen MC3T3-E1 Zellen und PBMCs. Die Ergebnisse sind dargestellt als IFN- γ Spots pro 10^5 Zellen. Die Lymphozyten wurden von Tieren mit einem etablierten s. c. Panc02-Tumor, die entweder mit (A, B) *S. pyogenes* Serotyp M49wt oder (C, D) dem Lysat behandelt wurden (je $n=7$ pro Zeitpunkt) bzw. äquivalente Volumina der Vehikellösung erhielten (je $n=12$), gewonnen. Tiere ohne i. t. Injektion dienten als Tumorkontrolltiere ($n=12$). Physiologische Werte wurden von unbehandelten Kontrolltieren erhalten ($n=3$). Angegeben sind der MW \pm SEM aus jeweils drei Versuchsansätzen von drei unabhängigen Experimenten. Mann-Whitney U-Test: * $p<0,05$ vs. Tumorkontrolle, # $p<0,05$ vs. Vehikel-PBS.

4.3.4. Analyse der lytischen Aktivität von Lymphozyten gegenüber syngen Zielzellen

Zur Beurteilung der Funktionalität der induzierten Immunantwort wurden in Zytotoxizitätsuntersuchungen aus mesenterialen und paraaortalen Lymphknoten gewonnene Lymphozyten mit Zielzellen (Panc02, EL4, CMT-93, MC3T3-E1, PBMC) in einem Effektor zu Target Verhältnis von 30:1 über Nacht kokultiviert. Der Nachweis der Zielzelllyse erfolgte durch die Messung der LDH, welches aus Zellen nach irreversibler Membranschädigung freigesetzt wird.

Dabei wurde eine infolge der Behandlung mit dem M49wt spezifische Lyse der Tumorzellen nachgewiesen, die mit der Dauer der Infektion kontinuierlich zunahm (Abb. 33 A). Bis zum Tag 28 nach bakteriolytischer Therapie stieg die lytische Aktivität der Lymphozyten

gegenüber Panc02 Zellen auf 51 ± 3 %. Um zu überprüfen, ob diese durch Lymphozyten-vermittelte Lyse der Zielzellen auch auf apoptotische Mechanismen zurückzuführen ist, wurden in durchflusszytometrischen Analysen zusätzlich CFSE-gefärbte apoptotische und nekrotische Zellen diskriminiert. Hierbei wurden initial nach Therapiebeginn vornehmlich frühapoptotische Panc02 Zellen anhand der intrazellulären Caspaseaktivität identifiziert (Abb. 34). Zu späteren Zeitpunkten zeigte sich, in Korrelation mit der Zunahme der LDH-Aktivität, dass die Lymphozyten sowohl apoptotischen, als auch nekrotischen Zelltod vermitteln, in dessen Konsequenz die Integrität der Plasmamembran verloren geht (Abb. 34). Demzufolge kommt es infolge der Therapie zu einer graduellen Zunahme des spezifischen zytolytischen Potentials der Lymphozyten.

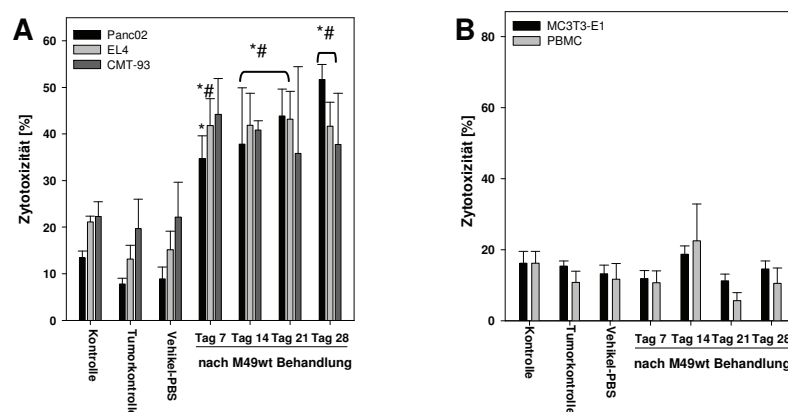


Abb. 33: Analyse der lytischen Aktivität von Lymphozyten gegenüber (A) malignen Panc02, EL4 und CMT-93 Zellen bzw. (B) nicht-malignen MC3T3-E1 Zellen und PBMCs. Die Ergebnisse sind dargestellt als prozentuale Zytotoxizität von Lymphozyten in einem Effektor:Target Verhältnis von 30:1. Die Lymphozyten wurden von Tieren mit einem etablierten s. c. Panc02-Tumor, die mit *S. pyogenes* Serotyp M49wt behandelt wurden (je $n=7$ pro Zeitpunkt) bzw. äquivalente Volumina der Vehikellösung erhielten (je $n=12$), gewonnen. Tiere ohne i. t. Injektion dienten als Tumorkontrolltiere ($n=12$). Physiologische Werte wurden von unbehandelten Kontrolltieren erhalten ($n=3$). Angegeben sind der MW \pm SEM aus jeweils drei Versuchsansätzen von drei unabhängigen Experimenten. Mann-Whitney U-Test: * $p < 0,05$ vs. Tumorkontrolle, # $p < 0,05$ vs. Vehikel-PBS.

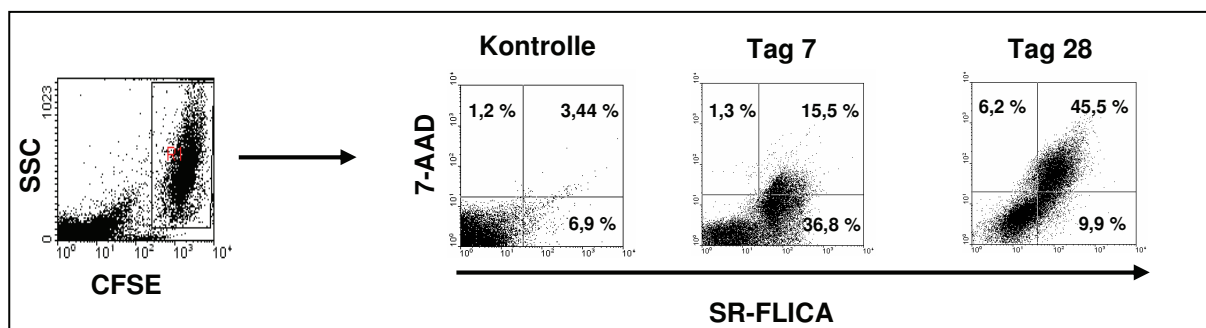


Abb. 34: Repräsentative durchflusszytometrische Darstellung der lytischen Aktivität von Lymphknoten-Lymphozyten gegenüber CFSE-gefärbten Panc02 Zellen in Kontrolltieren bzw. zum Zeitpunkt 7 und 28 Tage nach M49wt Behandlung. Um die Panc02 Zellpopulation wurde ein elektronisches „Gate“ gelegt (links). Für die Darstellung (früh- und spät-) apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen wurde dieses „Gate“ aktiviert, woraus der Anteil „toter“ Panc02 Zellen resultiert. Den Hintergrund machten spontan „tote“ Zellen aus, dessen Anteil jeweils unter 10 % lag.

Ferner bestätigte sich die, bereits im ELISpot beobachtete, lymphozytäre Kreuzreaktivität gegen syngene EL4 und CMT-93 Tumorzellen, die zu allen Untersuchungszeitpunkten über 35 % lag (Abb. 33A) und damit Ausdruck einer Induktion tumorspezifischer T-Zellantworten ist, obgleich im Rahmen der Untersuchungen nicht abschließend geklärt werden konnte, gegen welche Tumorzell-Epitope die T-Zellen gerichtet sind. Die Spezifität der induzierten antitumoralen Immunreaktion wurde jedoch bestätigt, indem Lymphozyten gegenüber nicht-malignen Kontrollzellen (MC3T3-E1, PBMC) nur eine marginale lytische Aktivität aufzeigten (Abb. 33B).

Nach der Behandlung mit dem Lysat konnte zeitabhängig ebenfalls eine erhöhte LDH-Freisetzung aus Panc02 Zellen nachgewiesen werden. Die stärkste zytotoxische Aktivität der Lymphozyten wurde am Tag 21 gemessen (Abb. 35A), was in Konkordanz mit der im ELISpot beobachteten Reaktivität steht. Daraus resultierend wurden bei den durchflusszytometrischen Analysen ebenfalls am Tag 21, $39,4 \pm 3,1$ % bzw. $7,4 \pm 2,0$ % der Panc02 Zellen als spätapoptotisch bzw. nekrotisch detektiert. Frühapoptotische Zellen, die aufgrund der Membranintegrität den Avitalfarbstoff 7-AAD ausschließen konnten, wurden allerdings auch zu späteren Zeitpunkten nur vereinzelt identifiziert (Abb. 36). Diese Resultate weisen somit darauf hin, dass die zytotoxischen Effekte primär auf die Induktion von Apoptose zurückzuführen sind.

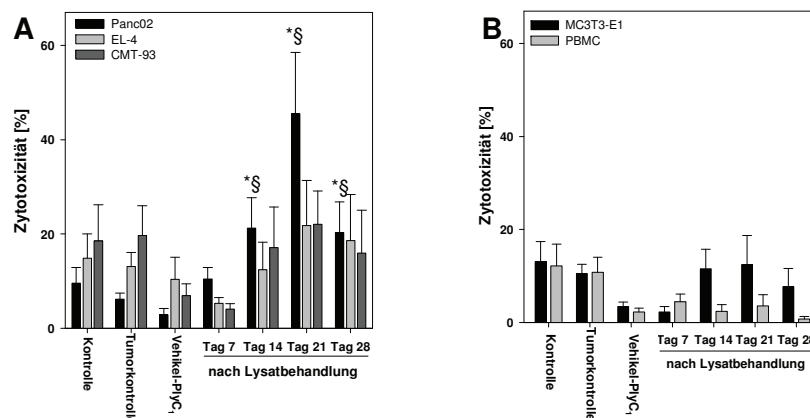


Abb. 35: Analyse der lytischen Aktivität von Lymphozyten gegenüber (A) malignen Panc02, EL4 und CMT-93 Zellen bzw. (B) nicht-malignen MC3T3-E1 Zellen und PBMCs. Die Ergebnisse sind dargestellt als prozentuale Zytotoxizität von Lymphozyten in einem Effektor:Target Verhältnis von 30:1. Die Lymphozyten wurden von Tieren mit einem etablierten s. c. Panc02-Tumor, die mit dem Lysat behandelt wurden (je $n=7$ pro Zeitpunkt) bzw. äquivalente Volumina der Vehikellösung erhielten (je $n=12$), gewonnen. Tiere ohne i. t. Injektion dienten als Tumorkontrolltiere ($n=12$). Physiologische Werte wurden von unbehandelten Kontrolltieren erhalten ($n=3$). Angegeben sind der MW \pm SEM aus jeweils drei Versuchsansätzen von drei unabhängigen Experimenten. Mann-Whitney U-Test: * $p<0,05$ vs. Tumorkontrolle, $^{\$}p<0,05$ vs. Vehikel-PlyC₁.

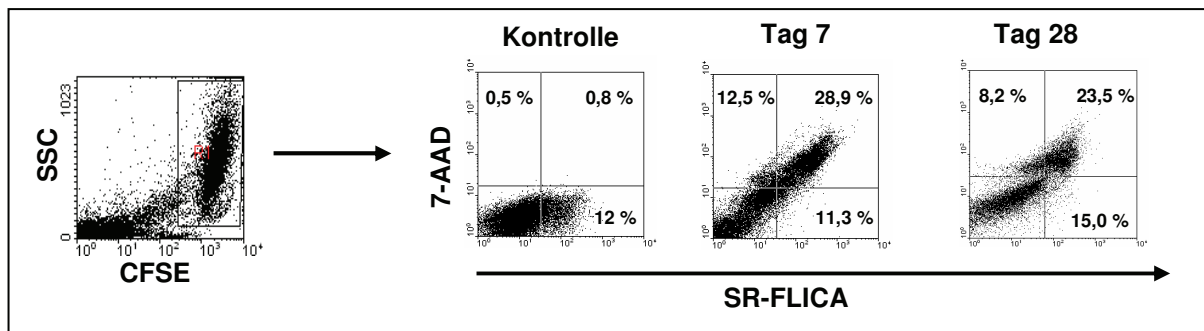


Abb. 36: Repräsentative durchflusszytometrische Darstellung der lytischen Aktivität von Lymphknoten-Lymphozyten gegenüber CFSE-gefärbten Panc02 Zellen in Kontrolltieren bzw. zum Zeitpunkt 7 und 28 Tage nach Lysatbehandlung. Um die Panc02 Zellpopulation wurde ein elektronisches „Gate“ gelegt (links). Für die Darstellung (früh- und spät-) apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen wurde dieses „Gate“ aktiviert, woraus der Anteil „toter“ Panc02 Zellen resultiert. Den Hintergrund machten spontan „tote“ Zellen aus, dessen Anteil jeweils unter 10 % lag.

Im Rahmen der weiterführenden Untersuchungen, bei denen die Lymphozyten-vermittelte Lyse syngener Tumorzellen (EL4, CMT-93) nach Lysatbehandlung quantifiziert wurde, zeigte sich interessanterweise nur eine marginale zytotoxische Aktivität, welche zu allen Untersuchungszeitpunkten auf Kontrollniveau lag (Abb. 35A). Diese Ergebnisse unterscheiden sich somit von den nach bakteriolytischer M49wt-Therapie erhobenen Daten. Daraus lässt sich schließen, dass durch die Lysatbehandlung tumorantigen-spezifische Effektorzellen generiert wurden, deren Reaktivität ausschließlich gegen Epitope gerichtet ist, die von Panc02 Zellen exprimiert werden. Diese Hypothese konnte zusätzlich durch die fehlende lytische Aktivität von Lymphozyten aus therapierten Tieren gegenüber den Fibroblasten (MC3T3-E1) und PBMCs bestätigt werden (Abb. 35B).

Anschließend sollte die Frage beantwortet werden, ob durch die gewählten Therapieschemata auch nach längerer Zeit noch tumorreaktive Lymphozyten nachweisbar sind bzw. ob sich eine tumorspezifische Gedächtnisantwort entwickelt hat. In Rechallenge-Experimenten zeigte sich, dass durch die M49wt- und die Lysatbehandlung keine vollständige protektive Immunität vermittelt wird. Zum *in vitro* Nachweis reaktiver Lymphozyten wurden 28 Tage nach dem Rechallenge Lymphozyten aus mesenterialen und paraaortalen Lymphknoten M49wt- und Lysat-behandelter Tiere entnommen und deren Funktionalität *ex vivo* analysiert. Hierzu wurden die Lymphozyten mit CFSE-gefärbten Panc02 Zellen für 20 h kokultiviert und die Zelllyse anschließend durchflusszytometrisch anhand CFSE/Propidiumjodid-positiver Zellen bestimmt (Abb. 37B). Die Anzahl doppelt positiver Panc02 Zellen gab dabei Aufschluss über die zellvermittelte Toxizität. Bei diesen Untersuchungen konnte infolge der Kultivierung mit Lymphozyten aus M49wt-Tieren bei 60 % der Zellen ($p < 0,05$) eine Lyse nachgewiesen werden (Abb. 37A). In parallelen stichprobenartigen Analysen wurden die Zellen nach Färbung von Oberflächenantigenen vornehmlich als CD3⁺ CD8⁺, CD19⁺ und NK1.1⁺ identifiziert. Die beobachteten Effekte sind damit tumorspezifisch. Dies gilt in vergleichbarer

Weise für Tiere, die zuvor mit dem Lysat behandelt wurden. Dabei wurden durchflusszytometrisch 54 % CFSE/Propidiumjodid-positive Panc02 Zellen detektiert, welche durch die Lymphozyten lysiert wurden (Abb. 37).

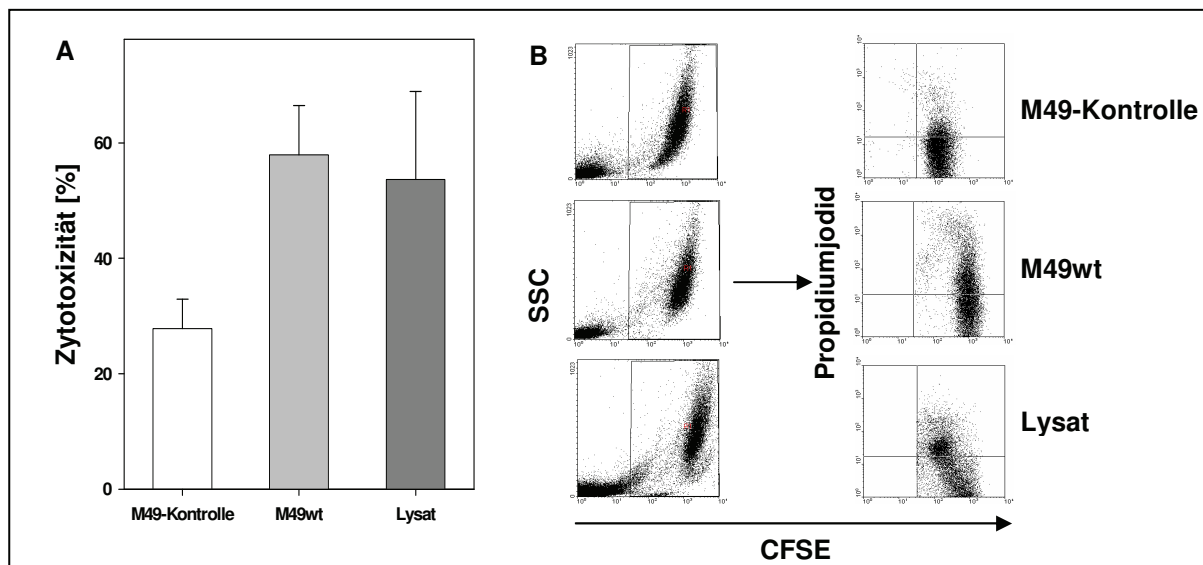


Abb. 37: Analyse der lytischen Aktivität von Lymphozyten gegenüber Panc02 Zellen. (A) Die Ergebnisse sind dargestellt als prozentuale Zytotoxizität von Lymphozyten in einem Effektor:Target Verhältnis von 30:1. (B) Repräsentative durchflusszytometrische Darstellung der lytischen Aktivität von Lymphknoten-Lymphozyten aus M49-Kontrolltieren und Rechallenge Tieren gegenüber CFSE-gefärbten Panc02 Zellen. Um die Panc02 Zellpopulation wurde ein elektronisches „Gate“ gelegt (links). Für die Darstellung CFSE/Propidiumjodid-positiver Zellen wurde dieses „Gate“ aktiviert, woraus der Anteil „toter“ Panc02 Zellen resultiert. Den Hintergrund machten spontan „tote“ Zellen aus, dessen Anteil jeweils unter 10 % lag.

Die lytische Aktivität war durch T- und B-Zellen, sowie NK-Zellen mediert. Diese Befunde weisen darauf hin, dass auch nach längerer Beobachtungszeit tumorreaktive Zellen vorhanden sind, die zytolytisches Potential besitzen. Die Anzahl der Zellen ist jedoch vermutlich zu gering, um *in vivo* die Entwicklung palpabler Tumoren vollständig zu inhibieren, welche jedoch deutlich verzögert ist.

4.3.5. Zusammenfassung

Innerhalb der *ex vivo* Untersuchungen zur phänotypischen und funktionellen Charakterisierung der Immunreaktion therapierter Tiere wurde nachgewiesen, dass

- sowohl die vitalen Bakterien des Wildtypstammes M49, als auch dessen Lysat eine starke systemische proinflammatorische Reaktion vermitteln, die initial vornehmlich durch Zellen der nicht-adaptiven Immunabwehr (Monozyten, Granulozyten, NK-Zellen) dominiert wird, im weiteren Verlauf spezifische Immunzellen aktiviert werden und simultan die Anzahl zirkulierender immunsupprimierender CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T_{reg} verringert wird.

- durch die bakteriolytische Therapie mit dem M49wt tumorreaktive Lymphozyten generiert werden, die *ex vivo* reaktivierbar sind und lytisches Potential gegenüber syngenen Tumorzellen verschiedener Entitäten besitzen.
- die Lysatbehandlung dagegen die Generierung von Effektorzellen triggert, die insbesondere gegen Panc02 Zellen reaktiv sind.
- zusätzlich zur lytischen Aktivität gegenüber Tumorzellen *in vitro*, eine partielle protektive Immunität *in vivo* mediert wird.

4.4. Histomorphologie und Immunhistochemie des Pankreastumorgewebes

Zur histologischen Beurteilung wurden Pankreastumoren von Tieren, die entweder mit dem M49wt oder mit dem Lysat behandelt wurden, sowie von unbehandelten bzw. Vehikel-behandelten Tieren zu entsprechenden Zeitpunkten entnommen. Von den Resektaten wurden Gefrierschnitte angefertigt und anschließend Übersichtspräparate anhand der HE-Färbung erstellt.

Tumoren von Kontrolltieren zeigten ein undifferenziertes pleomorphkerniges Tumorgewebe mit einzelnen fokalen Nekrosen (Abb. 38). Diese nekrotischen Areale wurden vornehmlich in Tumoren beobachtet, deren Wachstum mindestens über einen Zeitraum von vier Wochen erfolgte und vermutlich auf eine wachstumsbedingte verminderte Sauerstoffversorgung im Tumor zurückzuführen ist. Daraus resultiert die Korrelation zwischen Tumorgroße und Nekroseausbildung. Dabei zeigten sich keine Unterschiede zwischen Resektaten von Kontrolltieren ohne i. t. Injektion und denen mit i. t. Vehikelapplikation. Demzufolge wird durch die gewählte Applikationsart weder ein proinflammatorischer Stimulus noch eine Wachstumsalteration vermittelt.

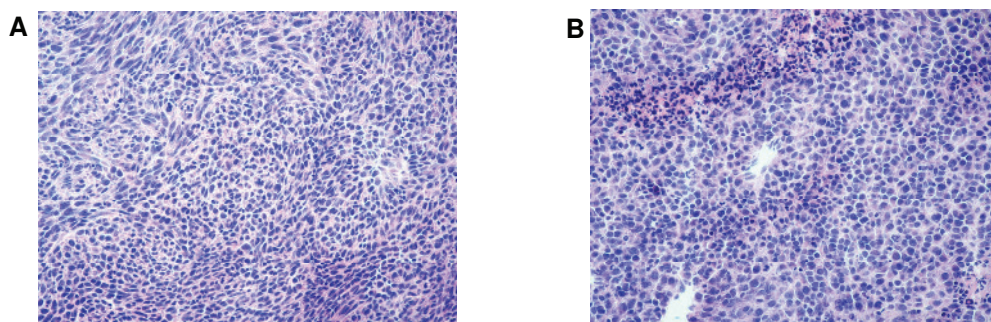


Abb. 38: Lichtmikroskopische Präparate von soliden Tumoren aus unbehandelten Kontrolltieren. (A) zeigt undifferenziertes Tumorgewebe ohne Nekrosen zu einem frühen Untersuchungszeitpunkt (14 Tage nach Tumorzellinjektion). (B) zeigt Gewebe eines lokal weit fortgeschrittenen Tumors mit fokalen Nekrosen (HE-Färbung, Originalvergrößerung 400fach).

Von einigen Kontrolltieren wurden zusätzlich Organproben entnommen, um eventuelle pathologische Veränderungen zu identifizieren, die infolge des Tumorwachstums auftreten.

Leberresektate, Milzen, Nieren und Pankreata der Tiere zeigten dabei lichtmikroskopisch unauffälliges Gewebe mit intakter Morphologie und regulärer Struktur (Abb. 39). Nur vereinzelt wurden in den Organen leukozytäre Infiltrationen nachgewiesen, welche jedoch in keinem Zusammenhang mit der Tumorgroße standen und auf individuelle Differenzen bei den Tieren zurückzuführen sind.

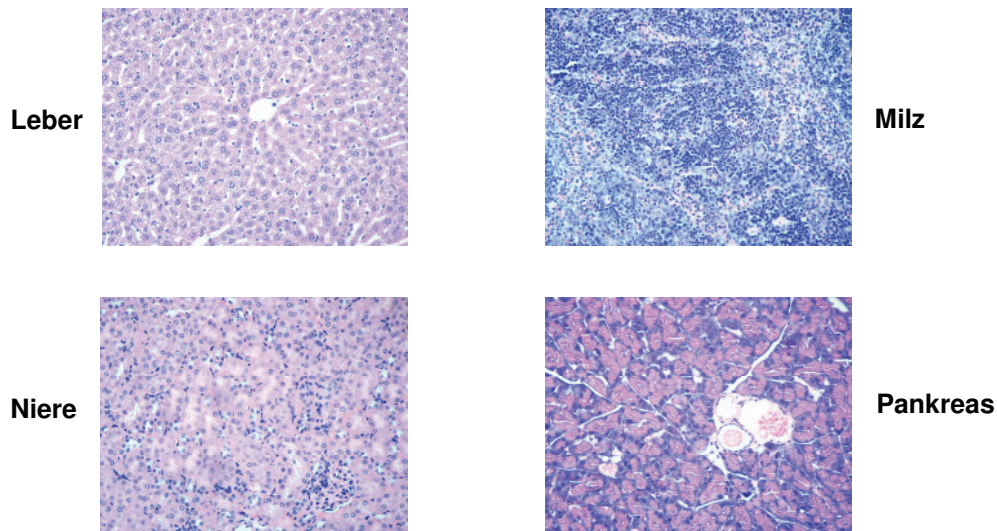


Abb. 39: Repräsentative lichtmikroskopische Präparate von Organen aus unbehandelten Kontrolltieren mit einem soliden Tumor. Lebern, Milzen, Nieren und Pankreata der Tiere zeigen unauffälliges Gewebe mit intakter Morphologie und regulärer Struktur. Vereinzelt können leukozytäre Infiltrationen nachgewiesen werden (HE-Färbung, Originalvergrößerung 400fach).

In Tumoren, die von M49wt- bzw. Lysat-behandelten Tieren entnommen wurden, konnten deutliche Tumorzellnekrosen mit teilweise sichtbarer leukozytärer Infiltration bereits 7 Tage nach Therapiebeginn nachgewiesen werden (Abb. 40). Zu späteren Untersuchungszeitpunkten konnten aufgrund der extensiven Tumorreduktion nur bei einigen Tieren Resektate entnommen werden. Dies gilt in besonderer Weise für Tiere, die mit dem M49wt behandelt wurden und bei denen es innerhalb von 28 Tagen zu einer kompletten Regression der Panc02-Tumoren kam. Entsprechend konnte hier nur bei zwei von sieben Tieren eine mikroskopische Beurteilung der Tumoren durchgeführt werden. Durch die Therapie mit dem Lysat wurde makroskopisch ebenfalls eine extensive Tumorreduktion beobachtet, die jedoch nur bei zwei von sieben Tieren in eine vollständige Remission mündete. Bei den erhaltenen Tumorsektaten wurden insbesondere zu späten Untersuchungszeitpunkten große nekrotische und apoptotische Areale nachgewiesen (Abb. 41).

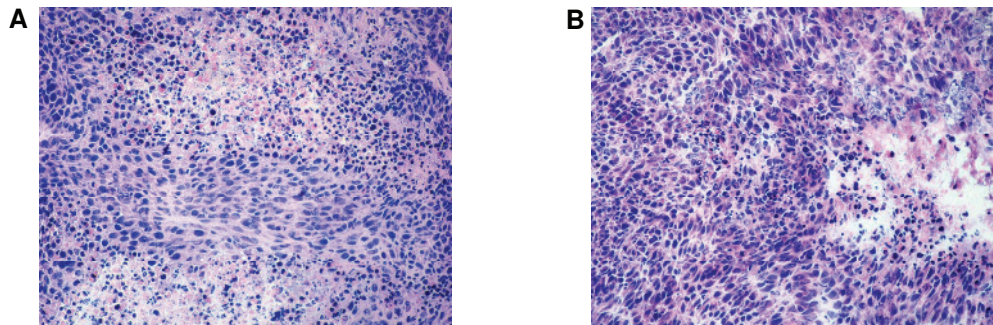


Abb. 40: Lichtmikroskopische Präparate von Tumoren (A) M49wt- bzw. (B) Lysat-behandelter Tiere zum Zeitpunkt 7 Tage nach Therapiebeginn. Im Gewebe können deutlich nekrotische Areale nachgewiesen werden. Durch die Behandlung mit dem M49wt kommt es zusätzlich zu massiven leukozytären Infiltrationen (HE-Färbung, Originalvergrößerung 400fach)

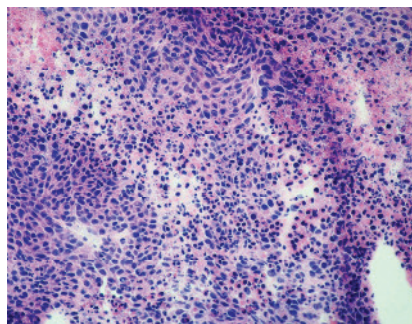


Abb. 41: Lichtmikroskopisches Präparat von Tumoren Lysat-behandelter Tiere zum Zeitpunkt 28 Tage nach Therapiebeginn. Im Gewebe können deutlich nekrotische und apoptotische Areale nachgewiesen werden (HE-Färbung, Originalvergrößerung 400fach).

Die histologischen Untersuchungen verschiedener peripherer Organe tumortragender Kontrolltiere haben, wie in Abbildung 39 repräsentativ dargestellt, gezeigt, dass durch das Tumorstadium allein keine pathologischen Veränderungen an den Organen auftreten. Potentielle Organveränderungen nach der Therapie erlauben somit direkt Rückschlüsse auf eine systemische Toxizität der Behandlung. Um dies zu beurteilen, wurden ebenfalls Präparate von Leberresektaten, Milzen, Nieren und Pankreata von M49wt- und Lysat-therapierten Tieren begutachtet. Wie auch bei den Kontrolltieren, wiesen die Organe zeitunabhängig keine Veränderungen der Struktur auf. Alle Gewebe waren zu allen Untersuchungszeitpunkten ohne erkennbaren pathologischen Befund. In den Abbildungen 42 und 43 sind exemplarisch histologische Präparate zum Zeitpunkt 28 Tage nach Therapiebeginn dargestellt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass durch die lokale therapeutische Intervention zwar eine, wie durch durchflusszytometrische Analysen belegt werden konnte, systemische proinflammatorische Reaktion induziert wird, es jedoch zu keiner Läsion der peripheren Organe kommt. Die gewählten Behandlungen induzieren somit keine systemische Toxizität.

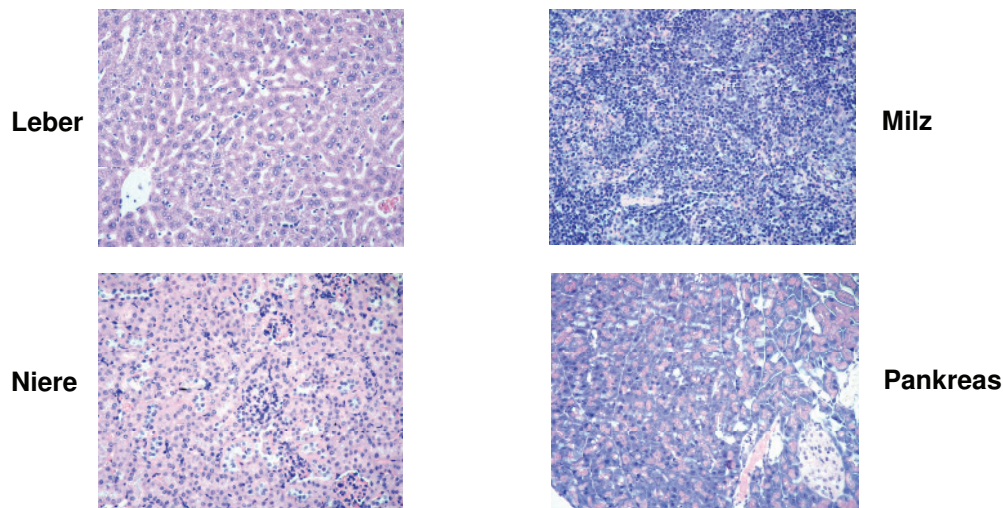


Abb. 42: Repräsentative lichtmikroskopische Präparate von Organen aus Tieren mit einem etablierten *s. c. Panc02*-Tumor, die mit *S. pyogenes* Serotyp M49wt behandelt wurden (Zeitpunkt 28 Tage). Lebern, Milzen, Nieren und Pankreata der Tiere zeigen unauffälliges Gewebe mit intakter Morphologie und regulärer Struktur (HE-Färbung, Originalvergrößerung 400fach).

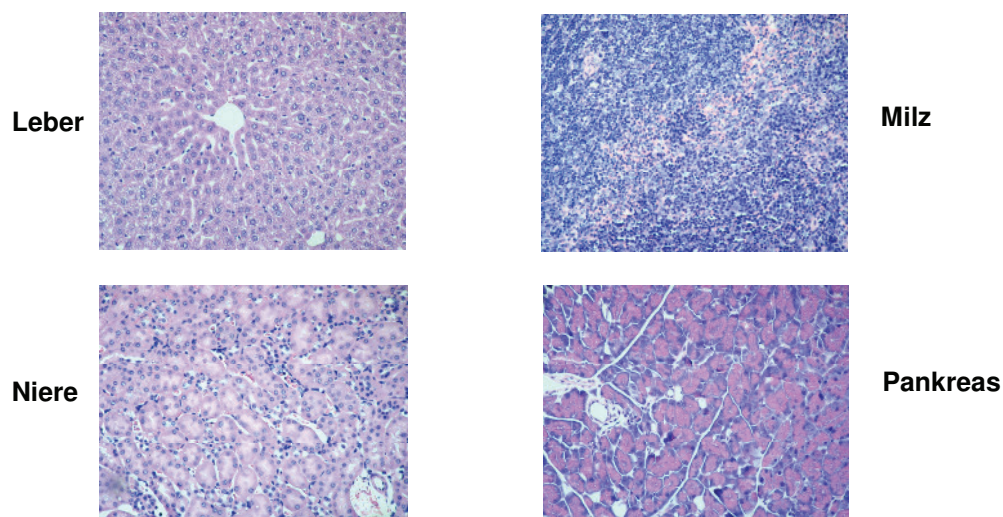


Abb. 43: Repräsentative lichtmikroskopische Präparate von Organen aus Tieren mit einem etablierten *s. c. Panc02*-Tumor, die mit dem Lysat behandelt wurden (Zeitpunkt 28 Tage). Lebern, Milzen, Nieren und Pankreata der Tiere zeigen unauffälliges Gewebe mit intakter Morphologie und regulärer Struktur (HE-Färbung, Originalvergrößerung 400fach).

4.4.1. Nachweis der therapieinduzierten Leukozyteninfiltration mit der As-D Färbung

Die Visualisierung tumorinfiltrierender Leukozyten erfolgte mit der As-D Färbung. Hierbei werden insbesondere neutrophile Granulozyten und deren Vorläuferzellen durch eine leuchtend rote Farbreaktion dargestellt, während Monozyten anhand locker verteilter kleiner positiv reagierender Granula nachgewiesen werden können.

In Tumoren von Kontrolltieren wurden nur vereinzelt zelluläre Infiltrate beobachtet. Die Anzahl tumorinfiltrierender Granulozyten lag unter 10 Zellen/mm² (Abb. 46). Interessanterweise zeigten jedoch die Vehikel-PlyC₁ Kontrolltiere eine erhöhte Infiltration, die vermutlich als Antwort auf die lokale Applikation des viralen Enzyms PlyC₁ zurückzuführen ist und eine unspezifische proinflammatorische Reaktion darstellt. Entsprechend ist die, nach Lysatbehandlung beobachtete, transiente Zunahme der Anzahl tumorinfiltrierender Granulozyten ebenfalls vornehmlich auf die PlyC₁-Applikation zurückzuführen, welche in keinem direkten Zusammenhang mit der *in vivo* nachgewiesenen Tumorregression steht (Abb. 44).

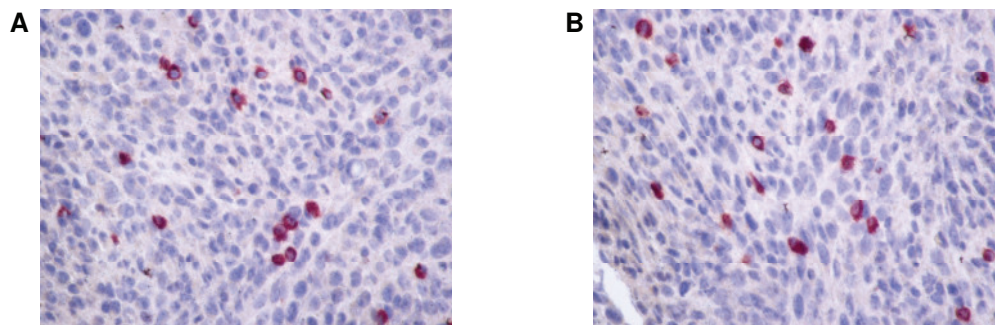


Abb. 44: Lichtmikroskopische Präparate von Tumoren aus (A) Vehikel-PlyC₁ Tieren und (B) Lysat-behandelten Tieren zum Zeitpunkt 7 Tage nach Therapiebeginn. Im Gewebe können vereinzelt infiltrierende Leukozyten visualisiert werden. Das Ausmaß der leukozytären Infiltration differiert zwischen den Gruppen nur leicht (As-D Färbung, Originalvergrößerung 400fach).

Demgegenüber zeigte die quantitative Analyse einen 10-fachen Anstieg infiltrierender Leukozyten am Tag 7 nach M49wt Therapie (Abb. 46). Dieser histologische Befund (Abb. 45) ist konkordant zu den hämatologischen und durchflusszytometrischen Ergebnissen, bei denen initial ebenfalls systemisch ein massiver Anstieg sowohl von proinflammatorischen Zytokinen als auch von Zellen der nicht-adaptiven Immunabwehr beobachtet wurde. Im Verlauf der Infektion wurde dann ein leichter Rückgang der granulozytären Infiltration festgestellt. Die Anzahl tumorinfiltrierender Leukozyten lag jedoch bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes am Tag 28 mit $39,7 \pm 16,9$ Zellen/mm² oberhalb der Kontrolltiere und steht in Konkordanz zu den *in vivo* Befunden hinsichtlich des proinflammatorischen Potentials des *S. pyogenes* M49wt.

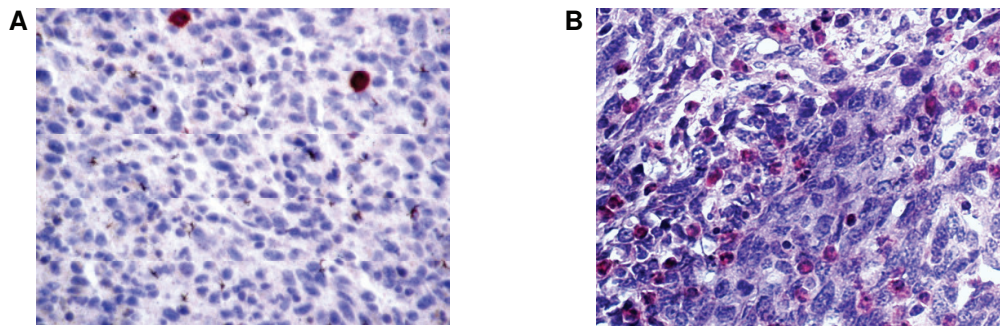


Abb. 45: Lichtmikroskopische Präparate von Tumoren aus (A) Vehikel-PBS Tieren und (B) M49wt-behandelten Tieren zum Zeitpunkt 7 Tage nach Therapiebeginn. Während in Tumoren von Vehikel-behandelten Kontrolltieren nur vereinzelt Infiltrate visualisiert werden können, kommt es nach bakteriolytischer Therapie zu einer massiven Infiltration neutrophiler Granulozyten in den Tumor (As-D Färbung, Originalvergrößerung 400fach).

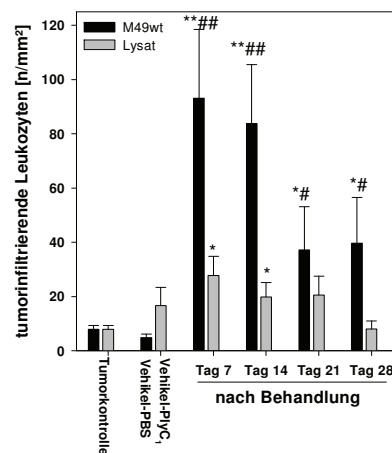


Abb. 46: Anzahl tumorinfiltrierender Leukozyten von Tieren mit einem etablierten *s. c. Panc02*-Tumor, die entweder mit *S. pyogenes* Serotyp M49wt oder dem Lysat behandelt wurden (je $n=7$ pro Zeitpunkt) bzw. äquivalente Volumina der Vehikellösung erhielten (je $n=12$). Tiere ohne i. t. Injektion dienten als Tumorkontrolltiere ($n=12$). Angegeben sind der MW \pm SEM. Mann-Whitney U-Test: * $p<0,05$ vs. Tumorkontrolle, ** $p<0,001$ vs. Tumorkontrolle, # $p<0,05$ vs. Vehikel-PBS, ## $p<0,001$ vs. Vehikel-PBS.

4.4.2. Immunhistochemischer Nachweis tumorinfiltrierender Lymphozyten

Um zu überprüfen, ob durch die Therapieschemata neben Granulozyten ebenfalls eine Akkumulation spezifischer Immunzellen induziert wird, wurden die Tumoren zusätzlich immunhistochemisch auf CD4⁺- und CD8⁺- infiltrierende Lymphozyten untersucht (Abb. 47).

In mit dem M49wt infizierten Tumoren zeigte sich initial nach Therapiebeginn mit $166,4 \pm 48,1$ Zellen/mm² ein deutlicher Anstieg der infiltrierenden CD8⁺ T-Zellen, welche auch zu späteren Zeitpunkten gegenüber den Kontrolltieren erhöht war (Abb. 48). Zusätzlich kam es postakut (Tag 14) zu einer deutlicher Zunahme der Anzahl CD4-positiver T-Zellen auf bis zu $148,5 \pm 19,4$ Zellen/mm² (vs. Vehikel-PBS $27,2 \pm 5,6$ Zellen/mm²). Am Tag 21 wurden dann nur marginal mehr tumorinfiltrierende Lymphozyten detektiert als in Kontrolltumoren (Abb. 48). Besonders auffällig war jedoch, dass in Tumorresektaten, bei denen die bakteriolytische Therapie makroskopisch nicht zur kompletten Regression führte (zwei von sieben Tumoren),

am Tag 28 erneut erhöhte Level CD4- und CD8-positiver T-Zellen nachgewiesen werden konnten, was erneut auf eine spezifische Aktivierung von T-Zellen hinweist.

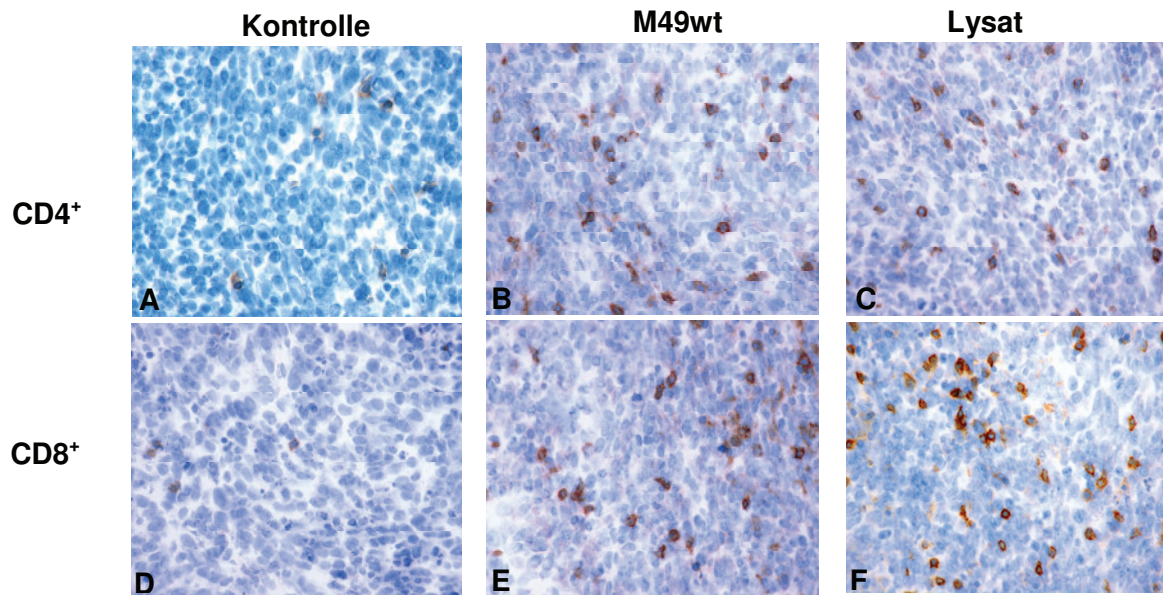


Abb. 47: Repräsentative immunhistochemische Präparate von Tumoren aus (A, D) Vehikel-PBS Tieren, (B, E) M49wt-behandelten Tieren und (C, F) Lysat-behandelten Tieren. (A, B, C) zeigen eine immunhistochemische Färbung von CD4⁺ tumorinfiltrierenden T-Zellen. (D, E, F) zeigen eine immunhistochemische Färbung von CD8⁺ tumorinfiltrierenden T-Zellen. Während in den Kontrolltumoren nur vereinzelt Lymphozyten detektierbar sind, kommt es nach M49wt- und Lysattherapie zu einer massiven Zunahme sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen, die zur *in vivo* beobachteten Tumorregression beitragen können. Die Lymphozyten sind sekundär mit dem Chromogen DAB braun gefärbt (sekundärer AK: goat anti-rabbit, biotinyliert, Originalvergrößerung 400fach).

Vergleichbare Ergebnisse wurden nach Lysatbehandlung erhalten. Die Anzahl CD4⁺ infiltrierender T-Zellen stieg von $22,6 \pm 6,5$ Zellen/mm² in Kontrolltumoren auf $74,6 \pm 16,0$ Zellen/mm² am Tag 7 nach Lysattherapie (Abb. 48). Im weiteren Verlauf kam es zu einem leichten Rückgang der CD4⁺ T-Zellinfiltration, welche aber bis zum Tag 28 kontinuierlich oberhalb der Kontrolltiere lag. Die Analysen zum Nachweis CD8-positiver intratumoraler Lymphozyten zeigten einen analogen Verlauf, jedoch mit höheren Infiltrationsraten. So wurden am Tag 7 nach Lysatbehandlung $120,1 \pm 32,3$ Zellen/mm² detektiert, am Tag 28 waren es $58,1 \pm 28,6$ Zellen/mm² (Abb. 48). Interessanterweise wiesen Vehikel-behandelte Kontrolltiere ebenfalls vermehrt Infiltrate auf. Demzufolge werden durch das virale Enzym PlyC₁ nicht nur Granulozyten, wie dies im Rahmen der As-D Färbung gezeigt werden konnte, sondern auch Lymphozyten zu dem Tumor rekrutiert. Die Anzahl CD8⁺ zytotoxischer T-Zellen lag aber zu allen Untersuchungszeitpunkten mit durchschnittlich 52 Zellen/mm² unterhalb der von Lysat-behandelten Tieren (Abb. 48). Ebenso zeigten die Tumoren keine Wachstumsalteration *in vivo*, woraus folgt, dass die Beobachtungen primär auf unspezifische Mechanismen zurückzuführen sind.

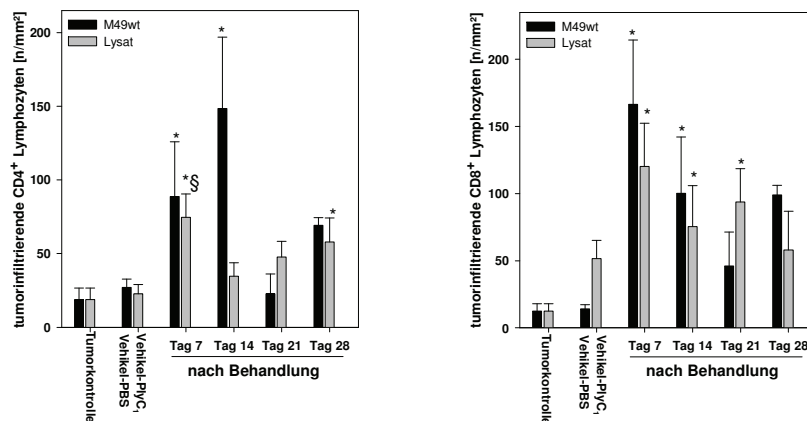


Abb. 48: Anzahl tumorinfiltrierender CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten von Tieren mit einem etablierten *s. c. Panc02*-Tumor, die entweder mit *S. pyogenes* Serotyp M49wt oder dem Lysat behandelt wurden (je $n=7$ pro Zeitpunkt) bzw. äquivalente Volumina der Vehikellösung erhielten (je $n=12$). Tiere ohne i. t. Injektion dienten als Tumorkontrolltiere ($n=12$). Angegeben sind der MW \pm SEM. Mann-Whitney U-Test: * $p<0,05$ vs. Tumorkontrolle, § $p<0,05$ vs. Vehikel-PlyC₁.

4.4.3. Immunhistochemische Analyse zur Vaskularisierung von Tumoren mit anti-von Willebrand Faktor

Solide Tumoren benötigen für ihr Wachstum die Neubildung von Blutgefäßen, da ab einer Tumorgöße von ca. 3 mm³ die Ernährung der Tumorzellen durch Diffusion nicht mehr gewährleistet ist. Die Endothelzellen bereits vorhandener Blutgefäße werden daraufhin aktiviert und proliferieren. Zur Migration in Richtung des Tumors finden sie dann Anschluss an das Gefäßsystem und vollenden die Neoangiogenese (136). Immunhistochemisch können Endothelzellen durch Nachweis der Antigene CD31, CD34 oder des vWF dargestellt werden. Die Anzahl der markierten Endothelzellen pro Gesichtsfeld, die in der vorliegenden Arbeit anhand des vWF nachgewiesen wurden, korreliert dabei mit der Vaskularisierung der Tumoren, welche einen potentiell prognostischen Faktor darstellt.

Zwischen den einzelnen Gruppen wurden zunächst nur marginale Unterschiede festgestellt. Die Panc02-Tumoren zeichneten sich generell durch wenig Endothel aus, welches diffus im Tumor verteilt ist (Abb. 49). Erst im Verlauf des Tumorwachstums wurden zunehmend vaskularisierte Tumoreareale anhand erhöhter vWF Expression detektiert, die vermutlich infolge einer Gewebshypoxie entstanden sind. Nach der Behandlung sowohl mit dem M49wt, als auch mit dem Lysat wurden fokale verstärkt vaskularisierte Bereiche insbesondere in nekrotischen Tumorregionen nachgewiesen (nicht gezeigt). Dabei konnte jedoch kein einheitliches Expressionsmuster aufgezeigt werden. Demzufolge kann bei Panc02-Tumoren keine eindeutige Korrelation zwischen dem Ausmaß der Neoangiogenese und der Malignität abgeleitet werden.

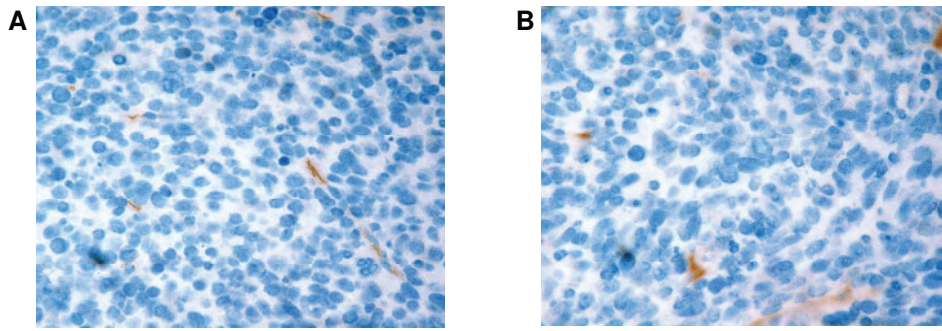


Abb. 49: Immunhistochemische Präparate von Tumoren aus (A) Vehikel-PBS Tieren und (B) M49wt-behandelten Tieren zum Zeitpunkt 14 Tage nach Therapiebeginn. Die Präparate zeigen als Nachweis für Vaskularisierung vWF-positive Endothelzellen. In Kontrolltumoren steigt die Anzahl vWF-exprimierender Zellen mit der Tumorgroße als Konsequenz der Gewebehypoxie. Durch die Behandlung mit dem M49wt können nur marginale Unterschiede hinsichtlich der vWF-Expression detektiert werden. Die Endothelzellen sind sekundär mit dem Chromogen DAB braun gefärbt (sekundärer AK: donkey anti-goat, biotinyliert, Originalvergrößerung 400fach).

4.4.4. Zusammenfassung

Im Rahmen der histologischen und immunhistochemischen Analysen konnte gezeigt werden, dass

- die einmalige i. t. Applikation der vitalen Wildtypbakterien M49 eine starke granulozytäre Infiltration vermittelt, wohingegen durch die Lysatbehandlung nur eine moderate Infiltration proinflammatorischer Zellen ausgelöst wird.
- beide Therapieschemata eine Infiltration von CD4⁺- und CD8⁺- T-Zellen induzieren, welche insbesondere in der primär postakuten Phase gegenüber unbehandelten Tieren signifikant erhöht ist.
- Panc02-Tumoren wenig vaskularisiert sind und dass keine Korrelation zwischen Neoangiogenese und Tumorpro- bzw. regression besteht.

V DISKUSSION

5.1. Aktive Immuntherapie beim Pankreaskarzinom

Humane Pankreastumoren zeichnen sich durch eine Akkumulation zytologischer, architektonischer und epigenetischer Alterationen aus, die zur Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapie beitragen (6). Hierzu zählen u. a. eine vermehrte, unkontrollierte Zellproliferation, eine Resistenz gegenüber wachstumsregulierenden Signalen und Apoptose, eine verstärkte Angiogenese, Gewebeinvasion und Metastasierung (12, 18, 137). Ein weiteres Merkmal des humanen duktales Pankreasadenokarzinoms ist eine starke desmoplastische Stromabildung. Der Anteil an neoplastischen Epithelzellen im Tumor ist dabei deutlich geringer als der Anteil an Stromazellen, zu denen hauptsächlich nicht-neoplastische Fibroblasten, Endothelzellen und Leukozyten zählen (138, 139). Komplexe Interaktionen zwischen den neoplastischen Pankreasepithelzellen, sowie den zellulären und nicht-zellulären Stromakomponenten haben Einfluss auf das Wachstum (140, 141), auf die Invasivität und die Migration der Adenokarzinome. Darüber hinaus sind humane Tumoren des Pankreas wenig immunogen, wodurch antitumorale Immunantworten zusätzlich supprimiert werden (142, 66). Diese Kombination verschiedener Mechanismen führt zur Genese eines schlecht differenzierten, sehr aggressiven Adenokarzinoms, welches ein geringes Ansprechen auf Tumorthapien aufweist (137, 143).

Vor diesem Hintergrund sind in den letzten Jahren neben den konventionellen Formen der Tumorthapie, der chirurgischen Resektion, sowie der Chemo- und Radiotherapie, immunologische Behandlungsformen immer mehr in den Fokus gerückt (144). Dabei wird im Rahmen von multimodalen Therapiekonzepten versucht, die Immuntherapie adjuvant zu etablieren. Es ist bekannt, dass die meisten Tumoren sich während ihrer Entwicklung mit dem Immunsystem auseinandersetzen und dass tumorspezifische Effektorzellen vorhanden sind. Es kommt jedoch bedingt durch verschiedenste Mechanismen, z. B. durch eine Anergieinduktion in den Effektorzellen, zu keiner Tumorabstoßung (32, 47). Um der Immunsuppression entgegenzuwirken und die Toleranz zu überwinden, kann eine Immuntherapie helfen, die idealerweise bei niedriger Tumorbeltung, z. B. nach Totalresektion anzuwenden ist. Die Immuntherapie zeichnet sich durch eine geringe Toxizität aus und kann damit gut mit einer Chemotherapie kombiniert werden. Ziel dieser Therapieform ist die Induktion einer endogenen, tumorantigen-spezifischen Immunantwort, die einen systemischen, dauerhaften Schutz vor residualen Tumorzellen und Mikrometastasen bietet.

Das Konzept der aktiven Immunstimulierung zur Behandlung von Tumoren geht auf Untersuchungen von W. B. Coley zurück. Er berichtete vor über 100 Jahren von Tumorumvakzinierungsversuchen mit bakteriellen Lysaten, die er verwendete, um antitumorale Immunantworten zu induzieren (98, 99). Coley behandelte damals primär inoperable Sarkompatienten gezielt mit diesen Toxinen und konnte zeigen, dass sich die Immunabwehr gegen Tumoren

dadurch steigern ließ und es in einigen Fällen zur Regression kam (99). Wenige Jahre später beschrieb auch Paul Ehrlich die Möglichkeit, Tumoren mit Hilfe des Immunsystems zu eliminieren (40).

Während immuntherapeutische Strategien heute bei einigen Tumorentitäten in klinischen Studien eingesetzt werden oder, wie z. B. der anti-CD20 Antikörper Rituximab beim niedrig-malignen Non-Hodgkin-Lymphom, bereits in der Tumorthherapie etabliert sind, (74), ist die Immuntherapie beim Pankreaskarzinom bis auf einige Aufnahmen fast ausschließlich auf experimentaltherapeutische Ansätze begrenzt. Hierbei ist die Kombination mit dem EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor Erlotinib die erste Therapieform, die gegenüber der Standardmonotherapie mit Gemcitabin einen Überlebensvorteil für Patienten erzielt. Erlotinib bindet intrazellulär selektiv an die Tyrosinkinase des EGFR und inhibiert so deren Phosphorylierung, wodurch das Zellwachstum gehemmt wird (30). Andere immuntherapeutische Strategien, wie z. B. Bevacizumab, ein monoklonaler Antikörper, der durch selektive Bindung an VEGF die Angiogenese hemmt und in der First-Line-Therapie gegen metastasierte kolorektale Karzinome (in Kombination mit 5-Fluorouracil plus Irinotecan) eingesetzt wird, zeigten beim Pankreaskarzinom nur limitierte therapeutische Effizienz (144). Ebenfalls untersucht wurden Trastuzumab, das an den HER-2/neu-Rezeptor bindet (75, 76), der Matrix Metalloproteinase Inhibitor Marimastat, sowie Farnesyltransferase-Inhibitoren, zur Hemmung der Aktivität von K-ras, welches bei >90 % der Pankreasadenokarzinome eine aktivierende Mutation aufweist (144, 145). Einige der Kombinationstherapien zeigten auch höhere Remissions- oder Krankheitsstabilisierungsraten, sowie längere progressionsfreie Intervalle. Im Vergleich zur Gemcitabin-Monotherapie konnte bis dato jedoch nur ein geringer Überlebensvorteil und keine deutliche Verbesserung der Lebensqualität erzielt werden (18, 75). Die Gründe hierfür sind vielfältig (1, 20, 146). So ist bekannt, dass Pankreastumoren sowohl eine systemische Immunsuppression im Organismus als auch eine lokale Immunsuppression am Ort des Tumorstwachstums auslösen und Immunzellen unzureichend aktiviert werden. Verschiedene Mechanismen, mit denen sich die Tumoren einer antitumoralen Immunabwehr entziehen können, sind beschrieben (1, 57, 147; 148). Hierzu zählen neben einer verminderten MHC-Klasse-I Expression auf der Zelloberfläche und der daraus resultierenden geringen Infiltration mit CTL, auch das Fehlen kostimulatorischer Moleküle (insbesondere B7.1), was T-Zellenergie induziert. Gleichzeitig wird die Expression von Adhäsionsmolekülen in den Effektorzellen herunterreguliert. Über die Sekretion der Zytokine IL-10 und TGF- β werden zusätzlich immunsuppressive T_{reg} rekrutiert. Es konnte gezeigt werden, dass bei Pankreaskarzinompatienten der Anteil an T_{reg} im Blut und im peritumoralen Gewebe erhöht ist und mit einer schlechteren Prognose korreliert (148). Pankreaskarzinom-spezifische Antigene (CEA, K-ras, MUC1, Gastrin) sind ebenfalls nur schwach immunogen (55, 89). Dadurch besteht bei der Vakzinierung mit nur einem oder wenigen Antigenen die Gefahr der Immunselektion,

d. h. es werden nur die Tumorzellen, die das entsprechende Antigen tragen, abgetötet. Zellen, die im Lauf der Tumorgenese dieses Antigen verloren haben, werden dagegen nicht erkannt und können dem Immunsystem entkommen. Nach neueren Erkenntnissen können bei suboptimaler Antigenstimulation neben einer quantitativ und qualitativ ungenügenden Menge an Effektorzellen, sogar T_{reg} induziert werden, die eine tumorspezifische Immunantwort auch nach Immunisierung unterdrücken. Die außerdem erst kürzlich beschriebene Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 in epithelialen Pankreaskarzinomzellen, der entscheidend für die Vermittlung der immunsuppressiven Funktion ist (64), trägt zusätzlich zur Immuntoleranz bei und stellt eine weitere Herausforderung bei der Entwicklung immuntherapeutischer Strategien dar. Zur Optimierung von Therapiekonzepten müssen demzufolge inhibitorische Faktoren und phänotypische Veränderungen des Tumors sowie die Bildung von Resistenzen und die von außen zugeführten immunaktivierenden Signale gleichzeitig betrachtet werden.

5.2. Auswahl eines geeigneten Pankreaskarzinommodells für die Immuntherapie

Die Behandlungsmöglichkeiten für Patienten mit gastroenteropankreatischen Tumoren sind -wie eingangs bereits dargelegt- trotz verbesserter Therapiekonzepte noch immer limitiert (1). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei < 5 % (2, 6; 147). Die Mortalitätsraten sind den Inzidenzraten fast identisch und belegen damit die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer bzw. zur Verbesserung von vorhandenen therapeutischen Strategien.

Entsprechende Untersuchungen werden in experimentellen Studien sowohl an isolierten Tumorzellen als auch an intakten Organismen durchgeführt (46, 83, 149, 150). Um jedoch spätere Therapiestudien bei Patienten zu begründen, sind *in vitro* Analysen aufgrund des fehlenden komplexen Mikromilieus allein nicht aussagekräftig genug. Mit Hilfe von Tiermodellen wird daher versucht, die Situation des humanen Krankheitsbildes möglichst exakt abzubilden. Für diese *in vivo* Untersuchungen stehen verschiedene xenogene und syngene Modelle zur Verfügung, die die Injektion von primären oder kultivierten Tumorzellen, sowie die chirurgische Implantation von Tumorfragmenten umfassen. Zusätzlich können experimentelle Tumoren durch chemische Mutagenese oder durch genetische Veränderungen (transgen oder/und knock out) induziert werden. Transgene Tiermodelle werden bislang jedoch noch fast ausschließlich für Validierungsstudien eingesetzt, die zum besseren Verständnis molekularer Grundlagen der Kanzerogenese beitragen sollen (151-153). Dabei gelang es der Arbeitsgruppe um David Tuveson ein murines Tumormodell zu entwickeln, das die mehrstufige Tumorprogression des menschlichen Pankreaskarzinoms widerspiegelt. Die transgenen Mäuse tragen eine mutierte Form von K-ras, welches bei 90 % der humanen Pankreastumoren mutiert ist. Diese Mutation ist flankiert von Lox-Stop-Lox (LSL)-Elementen,

die die Transkription und Translation zunächst verhindern. Die Expression des mutierten Allels wird dadurch erreicht, dass die LSL-KrasG12D-Mäuse mit Mäusen gekreuzt werden, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Pdx1 (pancreatic duodenal homeobox-1) Promoters exprimieren. Dies führt zum Herausschneiden des LSL-Elements und zur Expression der onkogenen Form des K-ras Proteins. Durch mehrere Kreuzungen konnten schließlich bei 27/28 der Tiere ein invasiv wachsendes Pankreaskarzinom mit malignem Aszites induziert werden, das auch Metastasierung u. a. in die Leber und die Lunge aufweist und damit dem humanen Pankreaskarzinom sehr ähnlich ist. Durch die Entwicklung dieses Tumormodells, steht ein Tumorprogressionsmodell zum humanen Krankheitsbild zur Verfügung, das zukünftig auch für Therapiestudien eingesetzt werden kann (154). Dahingegen sind xenogene Nackt- oder SCID (*Severe Combined Immunodeficiency*) Mausmodelle zur Induktion humaner Tumoren bereits heute gut etabliert und finden häufig Anwendung (155-157). Neben einer eingeschränkten Praxisrelevanz, ist der Einsatz dieser Modelle aber vor allem aufgrund der Immunkompromittierung der Tiere für immunologische Studien weniger geeignet und bleibt auf bestimmte experimentaltherapeutische Ansätze limitiert (158, 159).

Mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten syngen Pankreaskarzinommodell steht ein etabliertes und gut charakterisiertes Modell zur Verfügung, an dem immuntherapeutische Ansätze *in vivo* untersucht werden können. Die Tumorinduktion erfolgt durch Injektion von Zellen, die aus Pankreata tumortragender Mäuse isoliert wurden, die zuvor das Karzinogen 3-Methylcholanthren intrapankreatisch erhielten (127). Die daraus gewonnene Zelllinie Panc02 zeigt Charakteristika, die auch bei humanen Pankreaskarzinomzellen nachweisbar sind. So wurden bei diesen Zellen genetische Alterationen der Onkogene K-Ras und Her-2/neu, des Tumorsuppressorgens p53 und der CDK nachgewiesen, die zur Malignität beitragen (160). Außerdem zeichnen sich Panc02 Zellen durch eine verminderte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen aus, welche -wie für humane Pankreastumoren beschrieben- durch die verringerte Immunogenität auch zu einer gesteigerten Tumorigenität führt. Nach Injektion der Zellen in syngene C57Bl/6 Mäuse bilden sich undifferenzierte, wenig immunogene Tumoren. Histologisch weisen Panc02-Tumoren, im Gegensatz zu humanen Adenokarzinomen, nur einen sehr geringen Anteil an interstitiellem Bindegewebe auf (127, 161). Für immunologisch orientierte Therapiestrategien hat dieses Modell allerdings schon mehrfach erfolgreich Anwendung gefunden (129, 160).

Bei der Auswahl des sinnvollsten Modells, spielt, neben dem Projekt-spezifischen Vorhaben, ebenfalls die Lokalisation des Primärtumors eine Rolle. Die Tumorentwicklung kann entweder „organotypisch“ orthotop oder aber heterotop erfolgen, wobei die Tumoren subkutan wachsen (143). Bei dem Einsatz orthotoper Implantationstechniken werden in kleinen operativen Eingriffen Tumorzellen injiziert oder Tumorfragmente direkt in das Ursprungsorgan eingebracht. Die resultierenden Tumoren wachsen im Pankreasgewebe an, können sich

über die gleichen Wege ausbreiten, die einem spontan entstandenen Tumor zur Verfügung stehen und kommen so der klinischen Situation nahe. Besonders nachteilig ist aber, dass die orthotope Injektion von Tumorzellen häufig streuungsbedingte artifizielle Peritonealmetastasen zur Folge hat (151). Dies kann durch die Implantation von soliden Tumorfsegmenten umgangen werden. Ein genereller Nachteil orthotoper Tumormodelle liegt allerdings in der Überwachung des Tumorwachstums. *In vivo* können außer Gewichtskurven und eventuell palpablen Tumorgrößen kaum nennenswerte Daten erhoben werden. Die einzige Möglichkeit zur adäquaten nicht-invasiven Tumorüberwachung besteht daher in dem Einsatz aufwendiger und kostenintensiver bildgebender Verfahren (160, 162, 163).

Demgegenüber können durch die Verwendung subkutaner Implantationstechniken Veränderungen der Tumorgröße unter therapeutischem Einfluss unproblematisch protokolliert werden. Die Tumoren sind aufgrund ihrer subkutanen Lage für die Größenbestimmung und spezielle Therapieansätze gut zugänglich. Außerdem ist die Implantation der Tumorzellen chirurgisch einfach und mit hoher Reproduzierbarkeit durchführbar (164). Beeinträchtigend wirkt sich allerdings die Neigung der Tumoren zur Ulzeration aus, die zu mechanischer Behinderung der Tiere und Erhöhung der Infektionsrate führen kann. Der wichtigste Nachteil ist jedoch, dass die reale klinische Situation von Pankreaskarzinomen nur bedingt abgebildet werden kann. Subkutane Pankreastumoren wachsen ausschließlich lokal invasiv, zeigen jedoch keine Fernmetastasierung oder Infiltration in andere Organe. Die Untersuchung der Wirksamkeit eines neuen immuntherapeutischen Ansatzes, der auf lokaler Applikation basiert, rechtfertigt jedoch nicht nur den Einsatz des subkutanen Modells, sondern stellt dieses auch als am besten geeignet dar. Vor diesem Hintergrund sollte in der vorliegenden Arbeit das Potential einer aktiven Immuntherapie mit *S. pyogenes* untersucht werden. Die Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

5.3. Vergleich der eigenen Ergebnisse mit der Literatur

Die Charakterisierung der Infektiosität von Pankreaskarzinomzellen durch *S. pyogenes* stellte eine wesentliche Voraussetzung für die Untersuchung der Anwendbarkeit als potentielle Therapiestrategie im experimentellen Tiermodell dar. Im Rahmen von *in vitro* Arbeiten wurde zunächst der Einfluss von *S. pyogenes* Serotypstämmen auf die Proliferation und metabolische Aktivität von Adenokarzinomzellen des Pankreas untersucht. Es sollte herausgearbeitet werden, welche der Serotypen sich optimal zur zytotoxischen oder apoptotischen Abtötung der Tumorzellen einsetzen lassen, um nachfolgend die Effizienz des Therapieansatzes im Panc02-Tumormodell *in vivo* zu überprüfen. Die zugrunde liegende Arbeitshypothese ging davon aus, dass es infolge einer starken lokalen Toxizität von *S. pyogenes* direkt zur Tumorzellschädigung kommt und eine starke proinflammatorische Immunreaktion gegen die Bakte-

rien initiiert wird, die diesen lokalen Effekt verstärkt und systemisch auf die Induktion protektiver Immunantworten abzielt.

5.3.1. Zytotoxische Effekte von *S. pyogenes* auf murine und humane Pankreaskarzinomzellen

Bakterien der Gattung *S. pyogenes* besitzen die Fähigkeit die unterschiedlichsten Gewebe zu kolonisieren, um dort entweder als unbemerkter Kommensale zu überdauern oder unter entsprechenden Bedingungen eine Infektion hervorzurufen (122, 123). Die Mechanismen, über die Streptokokken humane epitheliale Zielzellen infizieren, sind gut verstanden. Der erste Schritt zur Infektion der Zielzellen erfolgt über die bakteriellen Adhäsine. Durch sie ist der Erreger in der Lage an das Epithelium bzw. Komponenten der extrazellulären Matrix zu adhären und sich zu etablieren. Zu den Adhäsinen zählen neben dem M-Protein die Fibronektin bindenden Proteine wie SfbI/Protein F, Serum Opacity Factor (SOF, auch als SfbII bezeichnet), Lipoteichonsäure und die Hyaluronsäurekapsel (122). Durch die Interaktion von Oberflächenproteinen mit der extrazellulären Matrix der Zielzelle kommt es nachfolgend zur Invasion, die über verschiedene Mechanismen, wie z. B. durch Bindung des M-Proteins an Laminin und Integrin auf der Zelloberfläche, vermittelt wird. Die Infektion mit *S. pyogenes* triggert die Freisetzung von Zytokinen (IL-1, IL-6, TNF, IFN). Diese Mediatoren lösen inflammatorische Prozesse aus, die zur Einwanderung phagozytotischer neutrophiler Granulozyten führen, die den gewebespezifischen Abbau verstärken und die Ausbreitung der Bakterien im Gewebe ermöglichen (133). Ausgehend von diesen Erkenntnissen, bei denen *S. pyogenes* ausschließlich die Rolle als Pathogen einnimmt, stellte sich die Frage nach einem potentiellen Einsatz der Bakterien zur Behandlung von Tumoren. Bekannt ist, dass Streptokokken bzw. deren mikrobielle Komponenten prinzipiell Tumorzellen schädigen können (165, 166). Schon Coley setzte vor mehr als einem Jahrhundert Lysate aus Streptokokken therapeutisch bei Tumorpatienten ein (99, 100). Untersuchungen zur Wirkungsweise von *S. pyogenes* auf Pankreaskarzinomzellen lagen bislang allerdings noch nicht vor. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die Fähigkeit der Bakterien analysiert, murine bzw. humane Pankreaskarzinomzellen zu infizieren. Dadurch sollte es einerseits möglich sein, direkte Effekte von *S. pyogenes* auf murine Panc02 Zellen zu identifizieren und damit die Voraussetzungen für die Anwendbarkeit im tierexperimentellen Modell zu schaffen. Auf der anderen Seite war im Hinblick auf einen potentiellen klinischen Einsatz aber auch von Interesse, das zytotoxische Potential der Bakterien auf humane Zellen des Pankreas (Panc-1, BxPC-3, Capan-2) zu untersuchen.

Es wurde festgestellt, dass *S. pyogenes* serotypspezifisch an Panc02 Zellen bindet und von diesen internalisiert wird, woraus eine Schädigung in den Zellen resultiert. Diese Ergebnisse wurden für humane Zellen bestätigt. Dennoch kann nicht genau gesagt werden, über welche Mechanismen die Adhärenz an die Zielzellen erfolgt, da die Bakterien mehrere Ad-

häsine exprimieren, die entweder dieselben oder aber unterschiedliche Zielmoleküle auf der Zelloberfläche binden können (133). In weiterführenden Untersuchungen, bei denen das Ausmaß der durch *S. pyogenes* induzierten Zellschädigung quantifiziert wurde, zeigte sich, dass die Bakterien nicht nur mit unterschiedlicher Affinität an die Pankreaskarzinomzellen binden, sondern zusätzlich Abweichungen in der Effizienz der Zellschädigung bestehen. Diese Befunde gehen einher mit verschiedenen Studien, in denen berichtet wird, dass abhängig vom infizierenden Serotyp, die Wirtszelladhärenz und Wirtszellinternalisierung, sowie die Ausprägung der Zelltodinduktion in den infizierten Zellen stark differiert (167, 168). Entsprechend vermittelten auch in der vorliegenden Arbeit die meisten Serotypen (insbesondere M3wt, M6wt, M18wt) nur eine marginale Läsion in den Tumorzellen. Dagegen führte die Infektion mit dem M49wt zu einer deutlichen Zellschädigung, die auf Apoptose und Nekrose zurückzuführen war. Es wurden aber Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien beobachtet. Bei den murinen Panc02 Zellen, sowie den humanen Panc-1 Zellen konnte innerhalb von 4 Stunden eine Zelllyse durch M49 induziert werden, die sich in einem Anstieg der extrazellulären LDH widerspiegelte. Begleitend wurde in den Tumorzellen ein deutlicher Anstieg der Sub-G1 Fraktion nachgewiesen, der charakteristisch für Apoptose ist. In den humanen Zelllinien BxPC-3 und Capan-2 wurde ebenfalls Apoptose induziert, jedoch in geringerem Ausmaß. Ebenso wurden nur ca. 30 % der Zellen durch den M49wt lysiert, was auf eine geringere Sensitivität der Zellen gegenüber *S. pyogenes* hindeutet. Es ist bekannt, dass die Sensitivität von Tumorzellen mit dem Grad der Differenzierung, dem Ploidiestatus und der Proliferationsrate korreliert (150, 169). Bei der Panc-1-Zelllinie handelt es sich um wenig bis undifferenzierte, aus dem duktalem Gewebe eines humanen Pankreaskarzinoms etablierte Zellen, die den murinen Panc02 Zellen vergleichbar sind. Die Zelllinien BxPC-3 und Capan-2 hingegen sind gut differenzierte Tumorzellen, die daraus resultierend schlechter und zeitlich verzögert auf die Behandlung mit *S. pyogenes* reagieren, jedoch trotzdem durch die Bakterien abgetötet werden können. Ausgehend von diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass Streptokokken prinzipiell für eine antitumorale Therapie auch beim humanen Pankreaskarzinom geeignet sind.

5.3.2. Der Einfluss von *S. pyogenes* auf Panc02-Tumoren *in vivo*

Vor dem therapeutischen Einsatz der Bakterien im Panc02-Modell waren einige Voruntersuchungen notwendig. Dabei stellte sich zunächst die Frage nach der Applikationsform und der maximal tolerablen Dosis, obwohl Streptokokkeninfektionen gut mit Penicillin behandelt werden können (170). In Studien, bei denen Bakterien bislang therapeutisch eingesetzt wurden, sind sowohl die lokale, intra- oder peritumorale, als auch die systemische Applikation beschrieben (109-111, 120). Für die Induktion einer effektiven Zellschädigung, die eine wesentliche Voraussetzung für den Erfolg der Immuntherapie darstellt, ist ein direkter Kontakt von

S. pyogenes mit der Zielzelle ebenso für die Initiation einer spezifischen T-Zellantwort notwendig (171). Darüber hinaus muss bei systemischer Exposition die potentielle Toxizität der Mikroorganismen in Betracht gezogen werden. Dies gilt vor allem im Hinblick auf einen potentiellen Einsatz der Bakterien bei Pankreaskarzinompatienten. Die Arbeitsgruppe um Ashbaugh konnte zeigen, dass die intravenöse Applikation von *S. pyogenes* innerhalb weniger Tage für CD1-Mäuse letal ist, wohingegen 50 % der Tiere eine lokale Infektion überlebten (171). Daraus folgend wurden die Bakterien in dieser Studie ebenfalls lokal appliziert. Bei der initialen Dosisfindungsstudie zeigte sich dann, dass bakterielle Dosen von $\geq 10^7$ cfu durch systemische Ausbreitung innerhalb von 7 Tagen zum Tod führen, geringere Dosen (10^5 – 10^6) aber gut toleriert werden. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass das Immunsystem in der Lage ist, die lokale Infektion bis zu einem gewissen Grad zu kontrollieren. Murine Makrophagen stellen eine effektive Abwehr gegenüber *S. pyogenes* dar (172). Deren Fähigkeit, die Bakterien in Abwesenheit von opsonisierenden Antikörpern zu phagozytieren, trägt entscheidend zur Kontrolle der Infektion bei (172). Eine primär starke Bakterienlast führt jedoch zur ineffizienten Abtötung der Bakterien, so dass sich die Streptokokken systemisch ausbreiten können. Dieser Infektionsverlauf ist letztlich für die Tiere letal. Subletale Dosen (10^6 cfu) sind dagegen mit keiner bzw. nur einer minimalen Toxizität verbunden. Dies konnte insofern bestätigt werden, da bei einer weiteren Gruppe gesunder, tumorfreier Tiere, die subkutane Applikation von *S. pyogenes* in der Dosis von 10^6 cfu keine lokale oder systemische Infektion induzierte. Für die nachfolgende immuntherapeutische Anwendung wurde daraufhin eine subletale Dosis (10^6 cfu) eingesetzt. Im Detail wurden folgende Ansätze näher untersucht: Der *S. pyogenes* Wildtypstamm M49 wurde mit der attenuierten SLS-defizienten Mutante (SLS⁻mu) verglichen. Durch die Inaktivierung eines für SLS kodierenden Gens (SagA = SLS-associated genes) und der damit verbundenen stark herunterregulierten Produktion des Toxins SLS, ist dieser Stamm weniger virulent. In einem parallelen Ansatz wurde außerdem ein avitales und damit minimal toxisches durch das Bakteriophagenlysin PlyC₁-induziertes Lysat vom M49wt eingesetzt und dessen antitumorales und immunstimulierendes Potential analysiert.

Bereits die einmalige intratumorale Injektion des M49wt führte bei den behandelten Mäusen innerhalb von 28 Tagen zu einer vollständigen Regression der zu Behandlungsbeginn palpablen Tumoren. Die Tiere blieben auch bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes tumorfrei. Bei keinem der Tiere kam es, wie dies in anderen Studien beschrieben wurde (110), zum erneuten Auswachsen des initial zurückgebildeten Tumors. Dies zeigte, dass die einmalige Applikation von *S. pyogenes* zur kompletten Tumorlyse führte. Im Gegensatz dazu wurde bei Tieren, welchen die SLS⁻ Deletionsmutante appliziert wurde, nur eine leichte Tumoregreduktion beobachtet, die auch nach längerer Beobachtungszeit zu keiner signifikanten Reduktion des Tumorwachstums führte. Diese Befunde unterstützen Beobachtungen aus

anderen Studien, in denen festgestellt wurde, dass durch die stark herunterregulierte Produktion des Toxins SLS, eine weniger virulente Mutante des Wildtyps entsteht (165, 173, 174). Datta et al. stellten in einem murinen Infektionsmodell fest, dass die SLS Produktion mit der Ausbreitung der Bakterien im Gewebe und dem Ausmaß der Zellschädigung assoziiert war (174). Tiere, die mit der SLS⁻ Deletionsmutante infiziert wurden, entwickelten nur minimale nekrotische Hautläsionen. Ähnliche Reaktionen wurden nach Infektion der Panc02-Tumoren beobachtet. SLS ist eines der stärksten bekannten Zytolysine, welches Zielzellen durch Bildung von Poren in der Membran schädigt (175). Neben Erythrozyten und Thrombozyten wurde ebenso die Lyse von Tumorzellen durch SLS beschrieben (149, 165). Dies lässt vermuten, dass dem Toxin sowohl direkt bei der Schädigung der Pankreastumorzellen, als auch indirekt durch Vermittlung immunologischer Effekte eine wichtige Rolle zukommt und dass dessen Verlust das therapeutische Potential von *S. pyogenes* fast vollständig aufhebt. Ferner zeigen die Ergebnisse, dass die nach bakteriolytischer Therapie mit dem M49wt beobachteten Effekte spezifisch sind. Eine i. t. Applikation der Trägerlösung PBS in tumortragende Kontrolltiere führte zu keiner Alteration des Tumorwachstums. Bei allen Kontrollgruppen kam es zu progressivem Tumorwachstum. In Analogie zu Daten aus der Literatur (176, 177) konnte damit bestätigt werden, dass die direkte Injektion in den Tumor keine unspezifischen Nebeneffekte hervorruft, was eine wichtige Voraussetzung für die weitere Anwendbarkeit der Therapiestrategie darstellt.

Das therapeutische Potential von *S. pyogenes* wurde ferner durch die Ergebnisse der Behandlung mit dem lysierten M49wt untermauert. Überraschenderweise führte die Lysatapplikation, welches ebenfalls das Toxin SLS enthielt, zu einer deutlichen Beeinflussung des Tumorwachstums. Bei zwei der sieben Panc02-Tumoren wurde sogar eine vollständige Tumoregression erzielt. Diese Ergebnisse wurden jedoch erst nach wiederholter Behandlung erhalten, da die einmalige Lysatinjektion lediglich zu einer minimalen Alteration des Tumorwachstums führte. In Konkordanz zu diesen Befunden wurden in anderen Studien ebenfalls nur nach mehrfacher Vakzinierung antitumorale Effekte beschrieben (178, 179). Da avitale bakterielle Strukturen weniger starke proinflammatorische Reaktionen hervorrufen, kann folglich vermutet werden, dass erst die repetitive Gabe des Lysates eine effektive aseptische Entzündungsreaktion hervorruft, die sekundär zur Stagnation des Tumorwachstums bzw. Tumoregression beiträgt, die jedoch ebenso spezifisch ist. Alle Panc02-Tumoren der Kontrollgruppe imponierten durch konstantes Wachstum. Weder das virale Enzym PlyC₁ allein, noch dessen wiederholte i. t. Injektion, beeinflussten das Panc02-Tumorwachstum.

Die Ergebnisse der Behandlung mit Lysat waren dadurch mit den Effekten des Wildtyps M49 vergleichbar und belegten das antitumorale Potential von *S. pyogenes* eindrucksvoll. Allerdings muss in Betracht gezogen werden, dass bei diesen Therapieansätzen auch die Ausgangstumorgroße den Behandlungserfolg beeinflusst. Da man davon ausgeht, dass eine

Immuntherapie nur gegen eine begrenzte Zahl von Tumorzellen effektiv sein kann, betrug die durchschnittliche Tumorgroße zu Beginn der Therapie ebenfalls $\leq 100 \text{ mm}^3$ und war damit mit anderen Studien vergleichbar, in denen bereits von antitumoralen Effekten infolge lokaler aktiver Immuntherapien berichtet wurde (176, 177, 180). Es ist somit fraglich, ob vergleichbare Erfolge auch bei großen, etablierten Tumoren mit intaktem Mikromilieu, sowie nach Metastasierung erzielt werden können. Verschiedene Tumor-Escapemechanismen verhindern, trotz Immunstimulierung und T-Zellaktivierung, häufig zelluläre Immunantworten durch CTLs und damit eine erfolgreiche Tumorabstoßung (47). Bei einigen Tumoren konnte gezeigt werden, dass APC in der Umgebung von Tumoren den T-Zellen Antigene präsentieren, jedoch nur ungenügend kostimulatorische Moleküle exprimieren und so zur Anergie der Lymphozyten führen (47). Mit der Tumorgroße nimmt damit auch die Toleranzinduktion durch den Tumor in der Peripherie zu. Gleichzeitig ist bekannt, dass T-Zellen von Tieren sowie Patienten mit malignen Erkrankungen schlechter auf Stimulation reagieren als T-Zellen gesunder Kontrollgruppen, was vermutlich auf, von Tumoren produzierten „Milieufaktoren“ zurückzuführen ist, die lokal und auch in der Umgebung die Funktion von T-Zellen beeinflussen (35, 59). In dieser Arbeit wurde bei den Tieren nach Panc02-Tumorexposition ebenso eine leichte systemische Immunsuppression beobachtet, die sowohl NK- (NK1.1^+) Zellen als auch T- (CD4^+ , CD8^+) und B- (CD19^+) Zellen betraf und mit einem Anstieg von IL-10 verbunden war, welches durch Inhibition der Zytokinsekretion aus Lymphozyten (Makrophagen, NK-Zellen) zusätzlich immunsuppressiv wirkte.

Der Versuch, die Immuntoleranz zu überwinden und eine maximale Immunstimulierung auch bei großer Tumorlast zu erzielen, findet in verschiedenen experimentellen Studien zur aktiven Immuntherapie Anwendung (108, 110, 113). Die Bakterien bzw. mikrobiellen Komponenten werden häufig systemisch appliziert, da man davon ausgeht, dass durch eine systemische Exposition eine stärkere Immunstimulierung erreicht wird, als durch die lokale Applikation (108, 111-113). Zu den bekanntesten Ansätzen zählt hierbei die intravenöse Injektion mit attenuierten *Clostridium novyi* NT Sporen. Deren selektives Wachstum in exklusiv anoxischen Bereichen von Tumoren, das durch sekundäre Immunstimulierung zur Tumorregression führt, wurde dokumentiert (108-110). Bei der bakteriolytischen Therapie mit *C. novyi* nutzt man damit die Eigenschaft der intratumoralen Hypoxie, die mit klinischem Fortschreiten des Karzinoms zunimmt. Bei verschiedenen experimentellen Tumoren, bislang jedoch nicht beim Pankreaskarzinom, ist die therapeutische Wirksamkeit dieser Behandlungsform nachgewiesen worden (109, 110). Eine komplette Tumorregression wurde allerdings nur in den wenigsten Fällen erzielt, da offenbar vitale Tumorzellen im Randbereich der Tumoren, sowie potentielle Mikrometastasen vom Immunsystem nicht vollständig erfasst wurden (181).

5.3.3. Induktion systemischer antitumoraler Immunantworten infolge lokaler mikrobieller Injektion

Nachdem gezeigt werden konnte, dass *S. pyogenes in vivo* antitumoral wirksam ist, wurde anschließend untersucht, ob die beobachteten Effekte auch auf immunologischen Mechanismen beruhen und ob durch die Therapieregime spezifisch immunologische Effektorzellen generiert wurden. Hierfür wurden Immunzellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Therapiebeginn mit dem M49wt sowie dem Lysat lokal und systemisch charakterisiert.

In Übereinstimmung mit anderen Studien, die bereits Immunantworten infolge lokaler Infektionen beschreiben (116, 177), führte auch die Behandlung mit dem vitalen *S. pyogenes* M49wt zu einer massiven Induktion von Zellen der nicht-adaptiven Immunabwehr. Es kam zu einer transienten Leukozytose, die vor allem auf eine Zunahme segment- und stabförmiger neutrophiler Granulozyten als Antwort auf den frühen Anstieg des proinflammatorischen und chemotaktischen G-CSF zurückzuführen war. G-CSF stimuliert das Überleben und die Proliferation unreifer Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems (Prä-CFU) sowie determinierter Progenitorzellen für neutrophile Granulozyten (CFU-GM) und wirkt auf reife neutrophile Granulozyten (182). Durch G-CSF werden diese Zellen aktiviert und finden chemotaktisch den Weg zu Infektionsherden (182), in unserem Fall dem Panc02-Tumor, wo sie die Bakterien bzw. infizierte Tumorzellen aufnehmen und abtöten. Über die Th₁-Zyokine IFN- γ und TNF- α , die in der postakuten Phase, an den Tagen 7 und 14 vermehrt nachgewiesen wurden, konnten dann zusätzlich zirkulierende Makrophagen, Monozyten sowie NK-Zellen, die zytolytisches Potential besitzen, aktiviert und proinflammatorische Immunantworten verstärkt werden. Zur Bekämpfung der bakteriellen Infektion kam es ferner exklusiv nach M49wt Applikation zu einer sukzessiven Abnahme der Thrombozytenwerte, sowie des systemischen Hämatokrits, die von der Ausbildung einer hyperplastischen Splenomegalie begleitet war. Ähnliche Beobachtungen haben Cervi et al. gemacht, die eine negative Korrelation zwischen dem Hämatokrit und der Größe der Milz angeben. Demnach ist ein verringerter Hämatokrit indikativ für eine leukozytäre Volumenexpansion (183). Es ist jedoch hervorzuheben, dass die Effekte nicht in einer septischen Entzündungsreaktion begründet sind. Weder die makroskopischen, noch die histologischen (HE-Färbung) Untersuchungen gaben einen Hinweis auf eine Organschädigung. Dies gilt in identischer Weise für die Befunde der laborchemischen Analysen der Leberenzymwerte ASAT und ALAT, sowie der in allen Geweben intrazellulär vorkommenden LDH. Für alle Parameter wurden supranormale (Tag 7) bzw. physiologische (Tag 14, 21, 28) Werte erhalten. Verschiedene Studien wiesen jedoch nach, dass die frühe Phase einer *S. pyogenes* Infektion durch extensive Infiltration von Zellen der nicht-adaptiven Immunabwehr gekennzeichnet ist, die primär dem Schutz vor systemischer Dissemination der Bakterien dient (133, 184). Vergleichbares konnte in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Die lokale Infektion der Panc02-Tumoren mit dem M49wt führte zu einer massiven

Infiltration von Granulozyten in den Tumor, die ebenfalls insbesondere in der postakuten Phase (Tag 7, 14) ausgeprägt war.

Demzufolge sind auch die in der Milz detektierten immunologischen Veränderungen zunächst auf antibakterielle Abwehrmechanismen zurückzuführen, die sekundär zur Ausbildung antitumoraler Immunantworten beitragen. Diese Vermutung wird weiter unterstützt, da es nach M49wt Infektion zu einer stetigen Zunahme des Transferrinrezeptors CD71 kam und die bakterielle Infektion so über die Reduktion des Eisenangebotes für *S. pyogenes* kontrolliert werden konnte. Gleichzeitig wurden innerhalb der frühen postakuten Phase vermehrt Makrophagen, Monozyten, reife Granulozyten (CD11b⁺, Gr1⁺), sowie NK-Zellen (NK1.1⁺) nachgewiesen. Parallel kam es zu einer kontinuierlichen (CD80⁺) bzw. transienten (CD86⁺) Zunahme aktivierter Zellen, die auf die Generierung spezifischer Immunantworten hinwies. Dabei ist CD86 primär für die initiale T-Zell-Kostimulation und CD80 für die Aufrechterhaltung der T-Zellaktivierung entscheidend. So nimmt beispielsweise während der Reifung von B-Zellen und anderen APC -die im Laufe einer Immunantwort an der ersten Aktivierung von T-Zellen beteiligt sind- die Expression der B7-Moleküle (insbesondere CD80) zu (185). Ebenso führen verschiedene Zytokine, wie z. B. IFN- γ , welches nach M49wt Infektion erhöht vorlag, zu einer vermehrten Expression von CD86 (185). Es ist folglich davon auszugehen, dass die B7-Moleküle während der Immunantwort auf die lokale Infektion des Tumors mit *S. pyogenes* indirekt die Aktivierung der T-Zellen mediieren. Die bakteriolytische Therapie mit dem M49wt war zusätzlich auch mit migratorischen Prozessen assoziiert, die hauptsächlich den Austritt von reifen T-Zellen bewirken. Am Tag 28 nach der Infektion kam es zu einer deutlichen Abnahme von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in der Milz. Diese Vermutung wurde weiter durch die kontinuierlich verminderte Expression von L-Selektin unterstützt. CD62L ist vornehmlich auf naiven T-Zellen exprimiert, und wird während der Aktivierung aufgrund des L-Selektin „sheddings“ herunterreguliert (186). Dies deutete darauf hin, dass die Zellen in die Blutbahn bzw. sekundäre lymphatische Organe, dabei vornehmlich in Lymphknoten, migrierten, um dort als spezifische Effektorzellen Immunabwehrmechanismen zu vermitteln. Korrelierend wurde systemisch eine Erhöhung der Zytokine IL-6 und GM-CSF nachgewiesen, die vor allem von B- und T-Lymphozyten sowie von Makrophagen nach deren Aktivierung sezerniert werden (107). Da IL-6 ein Zytokin ist, das spezifisch B-Zellen zur Differenzierung anregt, und durch GM-CSF die Zytotoxizität von Lymphozyten gegenüber Tumorzellen gesteigert wird, war der in dieser Arbeit nachgewiesene Anstieg an den Tagen 14 und 21 nach bakteriolytischer Therapie ein weiterer Hinweis auf die Generierung spezifischer antitumoraler Immunantworten.

Darüber hinaus implizierten die nach Lysatbehandlung erhobenen Befunde, dass bereits die Anwesenheit mikrobieller Strukturen von *S. pyogenes* (Toxine, DNA, Zellwandbestandteile, etc.) ebenfalls Immunantworten gegen Panc02-Tumoren induziert. Aus der Literatur ist

bekannt, dass durch bakterielle DNA (sogenannte CpG-Motive) das Gefahrensignal einer mikrobiellen Infektion imitiert werden kann. Ausgehend von zunächst unspezifischen Reaktionen werden auch antitumorale Immunantworten vermittelt (117, 187). Tepel et al. konnten 2006 in einem orthotopen SCID-Mausmodell zum Pankreaskarzinom zusätzlich zeigen, dass neben DC vor allem NK-Zellen eine Inhibition des Tumorwachstums vermitteln (188). In Analogie zu diesen und den eigenen Untersuchungen nach M49wt Infektion kam es auch durch die Lysatbehandlung zu einer systemischen proinflammatorischen Reaktion, die vornehmlich durch Makrophagen, Monozyten (CD11b⁺) sowie NK-Zellen (NK1.1⁺) mediert wurde. Diese Zunahme von Zellen der nicht-adaptiven Immunabwehr im peripheren Blut war begleitet von einer massiven Erhöhung der Th₁-Zytokine G-CSF, GM-CSF und IFN- γ , die zur Verstärkung und Aufrechterhaltung der Immunreaktion beitrugen. Damit waren die Ergebnisse nach Einsatz des Lysates mit den Effekten des Wildtyps M49 hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der Immunstimulierung im peripheren Blut sowie der Sekretion proinflammatorischer Th₁-Zytokine vergleichbar.

Demgegenüber zeigten sich nach Lysatbehandlung andere immunologische Reaktionen in der Milz. Während die bakteriolytische Therapie mit dem M49wt eine massive Erhöhung von Zellen der nicht-adaptiven Immunabwehr (Makrophagen, Monozyten) initiierte, wurden vergleichbare Ergebnisse nach Lysatbehandlung nicht erhalten. Die Therapie führte ausschließlich zu einem marginalen Anstieg von CD11b⁺ und Gr1⁺ Zellen, welcher ebenfalls nur innerhalb der ersten 14 Tage nachweisbar war. Dies ließ vermuten, dass die beobachteten Effekte primär auf antibakterielle Mechanismen zurückzuführen waren, die dem Schutz vor systemischer Dissemination der Bakterien dienten. Es wurde daher deutlich, dass der Milz als immunologisches Organ eine wichtige Rolle bei der primären Infektabwehr zukommt (189). Bei der Vermittlung der antitumoralen Effekte nach Lysattherapie scheinen demnach eher die spezifischen Immunzellen der Milz eine wichtige Rolle zu spielen. Ähnlich wie beim CpG wurde durch die Anwesenheit lysierter *S. pyogenes* Bakterien dem Immunsystem vorgegeben, dass der Tumor bakteriellen Ursprungs sei (116, 117, 190). Entsprechend wurde infolge der Behandlung mit dem Lysat eine Aktivierung von Splenozyten beobachtet. Neben einer kontinuierlichen Erhöhung des B7-Moleküls CD80 wurde hier zusätzlich eine transiente, aber massive Zunahme von CD40 nachgewiesen, das auf reifen DC vermehrt exprimiert wird (191). Dies lässt darauf schließen, dass die Immunabwehr initial über DC erfolgt, wie dies in Studien nach immuntherapeutischem Einsatz bakterieller DNA-Motive (CpG) bereits beschrieben wurde (188, 190). Die Beeinflussung des Tumorwachstums stellt allerdings ein Resultat komplexer immunologischer Interaktionen dar. Dementsprechend wurden durch das Lysat folgende sekundäre Effekte hervorgerufen: Innerhalb der ersten Woche nach Therapiebeginn kam es zu einem deutlichen Anstieg des auf unreifen B-Zellen exprimierten Antigens CD19. L-Selektin wurde ebenfalls induziert, der Anteil von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen war

hingegen fast unverändert. Die leichte Zunahme an Tag 7 deutet daher maximal auf eine Induktion naiver T-Zellen hin. Dahingegen wurde ICAM-1 (CD54), das als wichtiger Mediator der zellulären Migration agiert, kontinuierlich vermehrt auf den Splenozyten exprimiert. Parallel kam es bis zum Tag 28 zu einer stetigen Zunahme NK1.1-positiver Zellen, welche vermutlich mit Aktivierungsprozessen assoziiert waren. NK-Zellen reagierten auf einen Stimulus, z. B. durch bakterielle Komponenten, mit einer vermehrten ICAM-1-Expression (192). Als Resultat der Aktivierung führen diese Zellen ihre Wirkung dann auf verschiedene Weise aus. Sie entwickeln lytische Aktivität, sezernieren, wie hier nach Lysatbehandlung, IFN- γ und GM-CSF als Th₁-Zytokine und initiieren die verstärkte Expression von Fc-Rezeptoren auf polymorphnukleären Leukozyten, verbunden mit einer Steigerung der ADCC (190).

Im Rahmen der phänotypischen Analysen zeigte sich außerdem, dass ein Teil der NK-Zellen simultan den dendritischen Zellmarker CD11c, sowie CD45R, welches auf B- und T-Zellen vorkommt, auf der Oberfläche trugen. Diese erst kürzlich identifizierte Zellpopulation der IKDC agiert als Vermittler zwischen nicht-adaptiver und adaptiver Immunität. Diese Zellen sind in der Lage, Tumorzellen direkt zu lysieren, naive T-Zellen zu aktivieren und ebenfalls durch die Produktion von IFN- γ APC zu stimulieren (36, 193). Die Funktion dieser Zellen bei der durch *S. pyogenes* medierten, antitumoralen Immunantwort speziell, sowie allgemein nach aktiver Immuntherapie, ist bislang nicht geklärt. Sowohl die bakteriolytische Therapie mit dem M49wt, als auch die Lysatbehandlung führten zu einer Induktion von Zellen in der Milz. Da IKDC unter physiologischen Bedingungen jedoch in nur sehr geringer Quantität (ca. 10.000-20000 Zellen/Milz, 193 und eigene Untersuchungen, nicht gezeigt) vorkommen, kann eine potentielle lytische Aktivität auch gegenüber Panc02-Tumorzellen abgeleitet werden.

Weiterführende Untersuchungen wiesen nach, dass die Anzahl zirkulierender T_{reg}, welche antitumorale Immunantworten supprimieren, durch die Therapieschemata nur wenig beeinflusst wurde. Ebenso konnte nicht bestätigt werden, dass T_{reg} durch Panc02-Tumoren induziert werden, wie dies in der Literatur beschrieben wurde (148, 194). Allerdings führten beide Therapieschemata im Verlauf zu einer Herabregulation von Foxp3 in der CD4⁺ CD25⁺ Zellfraktion, die nach bakteriolytischer Therapie mit dem M49wt etwas deutlicher ausgeprägt war, als nach Lysatbehandlung und auf die leicht abweichende Therapie-induzierte Tumoregression zurückzuführen sein könnte. Insgesamt implizieren die bisher gewonnenen Ergebnisse jedoch, dass bei subkutaner, nicht metastasierender Tumorlast die T_{reg} im peripheren Blut keinen bzw. nur einen geringen Einfluss auf den Erfolg einer Immuntherapie haben. Diese Befunde zur Rolle der T_{reg} beim Panc02-Tumormodell sind in zukünftigen Studien zu beachten, da in Publikationen auch über die Prävalenz von T_{reg} im Tumor und in Tumordrainierenden Lymphknoten berichtet wird, die in dieser Arbeit nicht systematisch untersucht wurden (35, 61). Anhand der immunhistochemischen Analysen CD4⁺-infiltrierender Zellen ergab sich allerdings kein sicherer Hinweis auf tumor-infiltrierende T_{reg}. Ein Vergleich von

Tumoren therapiert und nicht-therapiert Tiere zeigt deutlich, dass ausschließlich die Immuntherapie zur Infiltration von T-Zellen führt, welche sekundär zur Tumorregression beitragen. Während nicht-therapierte Panc02-Kontrolltumoren nahezu keine Infiltrationen aufwiesen, wurden sowohl nach der Therapie mit dem M49wt, als auch mit dem Lysat vermehrt CD4⁺ bzw. CD8⁺-infiltrierende T-Lymphozyten nachgewiesen, die onkolytisches Potential besitzen (50, 51, 82, 195, 196). Zusätzlich zu den abweichenden systemischen Immunreaktionen gab es auch lokal Unterschiede im Verteilungsmuster der T-Zellen. Die bakteriolytische Therapie mit dem M49wt führte bereits am Tag 7 zur maximalen Infiltration von CD4⁺ bzw. CD8⁺-Zellen, welche mit der makroskopisch schnellen Stagnation des Tumorstadiums korrelierte. Demgegenüber waren nach der Behandlung mit dem Lysat zwar initial weniger Infiltrate nachweisbar, die Anzahl infiltrierender CD8⁺-Zellen war jedoch über den gesamten Beobachtungszeitraum von vier Wochen deutlich erhöht und bestätigte die Induktion spezifischer Abwehrmechanismen, bei denen die CTL die wichtigsten Effektoren der Tumoralabwehr sind (50, 51, 82). Das Abtöten der Zielzellen durch CTL erfolgt dabei entweder direkt über den Perforin/Granzym-Weg oder indirekt durch Sekretion proinflammatorischer Th₁-Zytokine, wodurch weitere Effektorzellen (z. B. Makrophagen) stimuliert und damit Immunantworten verstärkt werden. Entsprechendes konnte auch in dieser Arbeit anhand der über den Zeitverlauf kontinuierlichen Zunahme von TNF- α , sowie einer anhaltend vermehrten IFN- γ -Konzentration im Plasma nachgewiesen werden (s. 4.2.6.).

Ein weiterer Befund der immunhistochemischen Untersuchungen von Tumoren aus Kontrolltieren, denen PlyC₁ lokal appliziert wurde, war die vergleichsweise starke Infiltration mit CD8⁺-Lymphozyten. Diese Infiltration korrelierte jedoch weder mit einer Alteration des Tumorstadiums, noch mit systemischen immunologischen Veränderungen (Induktion von Granulozyten, Monozyten, T-Zellen, Zytokinsekretion etc.). Daher sind die Beobachtungen vermutlich darauf zurückzuführen, dass das PlyC₁ unspezifisch als virales Fremd-Antigen erkannt wird, wie dies für andere virale Proteine ebenfalls berichtet wurde (197).

5.3.4. Funktionelle Analysen zu antitumoralen Immunreaktionen nach der aktiven Immuntherapie

In den vorliegenden Experimenten ebenso wie in der Literatur (195, 196) gab es zahlreiche Hinweise auf eine Beteiligung von sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen bei der Immunantwort gegen Tumoren. So erwiesen sich T-Helferzellen als notwendig für die Induktion einer tumorspezifischen CTL-Antwort *in vitro* wie auch *in vivo* in der Maus (196). Für den therapeutischen Erfolg waren allerdings ausschließlich die CTL, aber nicht die CD4⁺-Lymphozyten notwendig. Andere Studien beschreiben ebenfalls, dass eine Tumoralabwehr in Abhängigkeit vom jeweiligen Modell vornehmlich durch NK-Zellen und CTL vermittelt wird (190, 192).

Die Ergebnisse aus der vorliegenden Studie deuten auf eine Beteiligung sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems hin. So zeigten Splenozyten aus Mäusen

nach M49wt-Therapie eine frühe Reaktivierbarkeit *in vitro*, welche zur Freisetzung von IFN- γ im ELISpot-Assay führte. Die maximale Anzahl IFN- γ sezernierender Lymphozyten wurde bereits am Tag 7 nach bakteriolytischer Therapie nachgewiesen. Außerdem wurde eine Kreuzreaktivität gegenüber verschiedenen Tumorentitäten induziert. Alle syngenischen Tumorzellen, also neben Panc02 auch EL4 (Lymphom) und CMT-93 (Rektumkarzinom), triggerten zeitabhängig die antigeninduzierte Freisetzung von IFN- γ aus den Lymphozyten M49wt-therapierter Tiere. Dies resultierte jedoch nicht aus einem unspezifischen Aktivierungsprozess, da die Kokultivierung mit syngenischen nicht-malignen Kontrollzellen (MC3T3-E1, PBMC) nicht zur Lymphozyten-vermittelten IFN- γ Sekretion führte. Ebenso zeigten Lymphozyten tumortragender und tumorfreier Kontrolltiere keine Reaktivierbarkeit gegenüber den Zielzellen. Die beobachteten Effekte sind demnach spezifisch und weisen darauf hin, dass sowohl NK-Zellen, als auch CTL die Haupteffektorzellen der M49wt-medierten Panc02-Tumorabwehr waren. Beide Zellpopulationen sezernieren bei Aktivierung IFN- γ und wurden zu frühen Zeitpunkten nach bakteriolytischer Therapie zusammen mit den kostimulatorischen B7-Molekülen vermehrt in der Milz detektiert (s. 5.3.3.). Entsprechend des reduzierten Anteils an NK-Zellen, sowie der Migration von CD8⁺ T-Zellen aus der Milz in sekundäre lymphatische Organe zu späteren Untersuchungszeitpunkten, wurden am Tag 28 nach bakteriolytischer Therapie ebenfalls nur wenige IFN- γ sezernierende Lymphozyten nachgewiesen. Parallel wurde jedoch eine über den Zeitverlauf stetig zunehmende lytische Aktivität von Lymphknoten-Lymphozyten gegenüber Panc02-Tumorzellen festgestellt, die auf die Entwicklung einer tumorspezifischen Gedächtnisantwort hinwies. In entsprechenden Zytotoxizitätsuntersuchungen wurde das Ausmaß der durch Lymphozyten induzierten Zielzelllyse mittels LDH analysiert, welches aus Zellen nach irreversibler Membranschädigung freigesetzt wird. Diese Untersuchungen belegten, dass Panc02 Zellen von den Lymphozyten erkannt und in der Folge effektiv lysiert wurden. Lymphozyten, die am Tag 28 nach bakteriolytischer Therapie gewonnen wurden, induzierten bei bis zu 50 % der Panc02 Zellen innerhalb von 24 h eine irreversible Schädigung. Ergänzende durchflusszytometrische Analysen zeigten zusätzlich, dass diese Effekte initial auf apoptotische bzw. „aponekrotische“ Mechanismen zurückzuführen waren. Der Nachweis, dass sowohl NK-Zellen, als auch CTL in den Lymphknoten M49wt-therapierter Tiere deutlich häufiger detektiert wurden, als in nicht-therapierten Kontrolltieren, sowie deren Fähigkeit, in Zielzellen eine Apoptose auslösen zu können, war damit ein weiterer Hinweis, dass beide Zellpopulationen entscheidende Effektoren der Antitumorimmunität sind (50, 51). Der wichtigste Mediator zur Induktion von Apoptose in der Zielzelle ist dabei Granzym B, welches direkt die Tumorzellmembran zerstören kann (33). Nach Freisetzung wird es zusammen mit Perforin von den Tumorzellen aufgenommen und gelangt in das Zytosol. Dort kann Granzym B dann Caspasen vorzugsweise durch Spaltung nach der Aminosäure Aspartat aktivieren, die sich ihrerseits in einer komplexen Hierarchie gegenseitig

aktivieren (198). Innerhalb der Kaskade werden zunächst die Initiatorcaspasen (z. B. Casp-8) und anschließend die Effektorcaspasen (z. B. Casp-3) durch proteolytische Prozessierung aktiviert (198). Durch die Caspasenaktivierung wird die Schädigung irreversibel und es kommt zum Zelltod. Die zu späteren Zeitpunkten nach M49wt-Therapie beobachteten spätapoptotischen Zellläsionen könnten auf andere Zelltod-induzierende Mechanismen zurückzuführen sein. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass durch die bakteriolytische Therapie spezifische Effektorzellen generiert wurden, die bei erneutem Antigenkontakt schnell einen Zelltod in den Panc02 Zellen auslösen können. Demzufolge ist die Apoptose bereits nach 4 h soweit fortgeschritten, dass die Zellen durch Veränderungen der Plasmamembran als „spätapoptotisch“ identifiziert werden. Insgesamt deuten die Ergebnisse damit darauf hin, dass die Apoptose im Vordergrund steht, die Zellen jedoch auch in „sekundäre“ Nekrose übergehen, wodurch auch die Resultate der LDH-Zytotoxizitätsanalysen, hinsichtlich der kontinuierlichen Zunahme der lytischen Aktivität von Lymphozyten gegenüber Panc02-Tumorzellen, verifiziert wurden.

In Übereinstimmung mit dem ELISpot-Assay wurde beim LDH-Zytotoxizitätstest mit Lymphozyten M49wt-therapierter Tiere wiederum eine Kreuzreaktivität gegenüber den syngen Tumorzellen EL4 und CMT-93 nachgewiesen, die über den gesamten Zeitverlauf fast unverändert stark erhalten blieb. Damit wird die Hypothese untermauert, dass CTL nach Aktivierung und Reifung aus der Milz in die Lymphknoten wandern, wesentlich an der Lyse der Zielzellen beteiligt sind und Epitope auf verschiedenen Tumorentitäten erkennen. Ähnliches wurde auch von Bauer et al. festgestellt (130). Die Arbeitsgruppe berichtete in einer kürzlich veröffentlichten DC-Vakzinierungsstudie ebenfalls von Peptid-spezifischen CTL, die zytolytische Aktivität gegen Panc02-Pankreastumoren und C26-Kolontumoren besitzen. Sie konnten zeigen, dass diese Effekte auf der spezifischen Erkennung des H-2K^b-restringierten p15E₆₀₄₋₆₁₁ Peptids beruhen (130). Diese Annahme wird weiter unterstützt, da nach Lysatbehandlung ebenfalls tumorspezifische Effekte beobachtet wurden. Hierbei zeigte sich, dass in Analogie zu den phänotypischen Befunden der Splenozyten auch zu späteren Zeitpunkten noch reaktive NK- und T-Zellen in der Milz vorhanden waren (s. 5.3.3.). Bis zum Tag 21 nach der Lysattherapie wurde eine erhöhte IFN- γ Sekretion aus den Splenozyten durch Panc02 Zellen vermittelt. Anders als nach M49wt-Behandlung kam es jedoch nur am Tag 7 zu einer Kreuzreaktivität sowohl gegen die syngen malignen EL4 und CMT-93 Zellen, als auch gegen die Kontrollzellen MC3T3-E1 und PBMC, die daher auf tumorunspezifische Effekte zurückzuführen sind. Erwartungsgemäß wurde auch im Rahmen der funktionellen Zytotoxizitätsuntersuchungen nur eine marginale lytische Aktivität der Lymphknoten-Lymphozyten gegenüber den syngen Tumor- (EL4, CMT-93) und Kontrollzellen (MC3T3-E1, PBMC) nachgewiesen. Darüber hinaus zeigten immunologische Effektorzellen der Kontrollgruppen ebenfalls weder eine erhöhte IFN- γ Sekretion noch eine verstärkte lytische Aktivität nach

Kontakt mit den Zielzellen, wodurch einerseits die Spezifität der induzierten Immunantwort belegt wurde. Andererseits wurde aber auch nachgewiesen, dass die zuvor beschriebenen immunhistologischen Befunde hinsichtlich der vermehrten CD8⁺-Zellinfiltration PlyC₁-exponierter Kontrolltiere (s. 5.3.3.), wie bereits vermutet, ausschließlich auf unspezifischen Mechanismen beruhen, die in keinem Zusammenhang mit den immun-vermittelten Effekten nach Lysatbehandlung standen.

In den ergänzenden funktionellen Analysen konnte dann eine graduelle Zunahme der lytischen Aktivität von Lymphknoten-Lymphozyten gegenüber den Panc02 Zellen gezeigt werden, die am Tag 21 mit über 40 % Zielzelllyse am stärksten ausgeprägt und -in Analogie zu den Resultaten nach M49wt-Therapie- primär auf die Induktion von Apoptose zurückzuführen war. Allerdings ist zu bemerken, dass trotz starker Zielzelllyse insgesamt weniger Panc02 Zellen von den Lymphozyten abgetötet wurden als nach bakteriolytischer Therapie mit den vitalen Bakterien. Die durch die Lymphozyten vermittelten zytotoxischen Effekte waren jedoch so effektiv, dass es bereits nach 4 h zu einer irreversiblen Schädigung in den Zielzellen kam, so dass diese als „spätapoptotisch“ bzw. sekundär nekrotisch detektiert wurden. Dies könnte auf einen initial starken Aktivierungszustand der Lymphozyten hindeuten, die in der Lage waren, Panc02 Zellen effektiv zu lysieren. Aufgrund der beobachteten schnellen Zielzelllyse, sowie der phänotypischen Befunde von Immunzellen in Blut und Milz ist aber davon auszugehen, dass die Effekte zumindest bis zum Tag 21 eher durch NK-Zellen, als durch CTL mediert wurden. Damit liegt hier eine Differenz zu den Befunden nach bakteriolytischer Therapie mit dem M49wt vor. Ein besonderes Charakteristikum der NK-Zellen ist deren schnelle und direkte Lyse der Zielzellen durch Exozytose von -wie zuvor bereits beschrieben- mit Granzym A/B und Perforin gefüllten Granula, die an der Zielzelle Apoptose und Nekrose bewirken (33). Dies entsprach den beobachteten Vorgängen nach Kokultur von Lymphknoten-Lymphozyten Lysat-behandelter Tiere mit den Panc02 Zellen. Da NK-Zellen ihre Antitumor-Aktivität auch nicht MHC-restringiert entfalten, sind Immunreaktionen insbesondere bei Karzinomen mit reduzierter MHC-Klasse-I-Expression, wie den humanen und den murinen Pankreastumoren (1, 66, 199), durchaus wünschenswert (142). Die Notwendigkeit von NK-Zellen zur immun-vermittelten Tumorabwehr wurde ebenso bei der BCG-Immuntherapie des superfizialen Blasenkarzinoms beschrieben (119). BCG-aktivierte NK-Zellen können die Blasenkarzinomzellen effizient töten. Die Depletion dieser Zellpopulation durch anti-NK1.1 Antikörper führte jedoch im experimentellen C57Bl/6 Modell zu einer deutlich verminderten zellulären Zytotoxizität und hob den therapeutischen Effekt fast vollständig auf (118). In Analogie zu diesen Befunden könnte den NK-Zellen auch in der vorliegenden Arbeit eine Schlüsselrolle bei der induzierten Tumorabwehr zukommen. Dafür sprachen die systemisch konstant erhöhten IFN- Spiegel, die zu einer vermehrten Antigenpräsentation auf DC und einer Polarisierung der Immunantwort in Richtung Th₁ beitrugen, e-

benso wie der Nachweis, dass NK-Zellen die stärkste Zellpopulation sowohl in Blut, als auch in sekundär lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten) waren und der Anteil der CD8⁺-Lymphozyten nur transient anstieg.

Dessen ungeachtet könnte auch die fehlende Kreuzreaktivität gegenüber anderen syngen Tumorentitäten ein Hinweis darauf sein, dass hauptsächlich die NK-Zellen als Induktoren der Panc02-Zelllyse agierten. Ausgehend von den eigenen Ergebnissen und von Daten aus anderen Studien, wurden durch eine mikrobielle Immuntherapie nicht ausschließlich spezifisch gegen einen Tumor -in diesem Fall der Panc02-Tumor- gerichtete Immunantworten induziert (119). Vielmehr kommt es infolge der aktiven Immunstimulierung zu einer polyklonalen Aktivierung und Expansion von Effektorlymphozyten, welche gegen Epitope auf verschiedenen Tumorentitäten reaktiv sind (130, 200). Vergleichbares konnte nach der bakteriolytischen Therapie mit dem M49wt beobachtet werden. NK-Zellen besitzen allerdings im Gegensatz zu aktivierten T-Zellen, nur eine marginale lytische Aktivität gegenüber den EL4 Lymphomzellen (201). Ballas et al. berichteten 2001, dass die infolge einer Immuntherapie mit CpG generierten NK-Zellen, zwar die entscheidenden Effektoren zur Lyse von B16 Melanomzellen, jedoch nicht von EL4 Zellen waren (201), die ausschließlich durch aktivierte CTL abgetötet wurden. Demzufolge könnten auch die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde darauf zurückzuführen sein, dass NK-Zellen zwar die Panc02, aber nicht die EL4 Zellen lysieren konnten und dass der Anteil tumorreaktiver CTL in den Lymphknoten zunächst zu gering ist, um eine deutliche Schädigung in den syngen Tumorzellen zu vermitteln. Analog könnte dies trotz bislang fehlender Daten aus der Literatur für die kolorektalen CMT-93 Zellen gelten.

Am Tag 28 nach Lysatbehandlung war die zytotoxische Aktivität von Lymphknoten-Lymphozyten gegenüber allen untersuchten malignen Zellen (Panc02, EL4, CMT-93) mit jeweils ca. 20 % Zelllyse vergleichbar stark ausgeprägt. Gleichzeitig betrug die lytische Aktivität gegenüber den Kontrollzellen (MC3T3-E1, PBMC) deutlich weniger als 10 %. Die Beobachtungen sind folglich nicht auf unspezifische Mechanismen zurückzuführen. Sie implizieren damit, dass zwar initial weniger CTL aktiviert wurden, jedoch im Zeitverlauf die Anzahl funktioneller Lymphozyten bzw. die Reaktivität der Zellen gegenüber den Zielzellen zunimmt, welche dann in sekundär lymphatischen Organen (v. a. Lymphknoten) akkumulieren und tumorantigen-spezifisch Zielzellen lysieren können.

5.3.5. *S. pyogenes* vermittelt partielle protektive Immunität gegen Panc02-Tumoren *in vivo*

In Rechallenge-Untersuchungen, bei denen der Funktionalität der Immunreaktion überprüft wurde, konnte gezeigt werden, dass die *in vitro* Befunde auf zellulärer Ebene *in vivo* teilweise reproduzierbar waren. CTL stellen diejenige Zellpopulation dar, die für eine spezifische Tumorlyse und damit für den gewünschten immunologischen Effekt hauptsächlich verantwortlich ist. Die spezifische Aktivierung der CTL konnte nachgewiesen werden, da alle Tiere, bei denen es initial zu einer Therapie-bedingten Regression des Panc02-Tumors kam, eine deutliche Wachstumsverzögerung nach wiederholter Tumorzellapplikation aufwiesen, welche bis zum Tag 28 nach dem Rechallenge signifikant war. Die Untersuchungen ergaben aber auch, dass weder die Behandlung mit dem Lysat, noch die bakteriolytische M49wt-Therapie, eine vollständige dauerhafte, protektive Immunität *in vivo* vermittelte. Keines der Lysat-behandelten und nur eines der sechs M49wt-kurierten Tiere war in der Lage, den Tumor komplett abzustößen. Dies lässt den Schluss zu, dass die Therapie mit vitalen Bakterien im Vergleich zur Behandlung mit den lysierten *S. pyogenes*, nicht nur zu einer effizienteren Lyse auf zellulärer Ebene führt, sondern auch *in vivo* immunologisch effektiver war. In Analogie zu diesen Befunden konnten Avogradi et al. 2005 in einem murinen C57Bl/6 Tumorerkrankungsmodell zeigen, dass die Infektion von B16F10 Melanomzellen mit vitalen attenuierten Bakterien der Gattung *Salmonella typhimurium* eine systemische Antitumorimmunantwort induziert, die zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses führte (180). Die den Antitumoreffekten zugrunde liegenden Mechanismen beruhen auf einer mikrobiell-vermittelten Kreuzpräsentation von Tumorantigenen, wodurch CTLs aktiviert werden, die Tumorzellen antigenspezifisch lysieren können (180). Entsprechendes wurde auch von Eisold et al., 2007 berichtet. In dieser Studie konnte eine systemische Immunprotektion infolge lokaler und systemischer AAV-2-Infektionen bei syngenesischen Rattenpankreas Tumoren nachgewiesen werden (177). Erstaunlich bei diesen Untersuchungen war, dass die Tiere nach der Therapie gegen eine wiederholte DSL6A-Tumorzellexposition geschützt waren, obwohl es initial nicht zur vollständigen Tumoregression kam. Die Autoren erklärten die Effekte damit, dass die Anzahl reaktiver CD8⁺ T-Zellen zwar primär nicht ausreichend war, um etablierte Tumoren vollständig zu eliminieren, die CTLs jedoch bei erneutem Antigenkontakt -im Sinne einer immunologischen Gedächtnisantwort- schnell gegen die Pankreastumorzellen vorgehen konnten und damit die Tumoretablierung sowie die Ausbildung eines funktionellen Tumormikromilieus inhibierten, das sich vor infiltrierenden CD8⁺ T-Zellen schützen kann (177). Die infolge der Behandlung mit dem Lysat beobachteten Effekte entsprechen diesen und belegen die Induktion tumor-spezifischer Immunantworten. Sie zeigen außerdem, dass eine komplette Regression des Primärtumors nicht essentiell für die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses ist. Vielmehr von Bedeutung ist das komplexe Zusammenwirken verschiedener Faktoren, die sekundär zur Aktivierung und klonalen Expansion spezifischer Effektorzellen

führen, die nach erneuter Antigenexposition schnell peptidspezifisch reagieren und damit die Etablierung von Tumoren zumindest deutlich verzögern können. Entsprechend waren auch in dieser Arbeit die Ergebnisse nach dem Rechallenge in beiden Gruppen in Bezug auf die Wachstumsverzögerung der Panc02-Tumoren (ca. 75 % im Vergleich zu Kontrollgruppen) identisch, obwohl ursprünglich nur durch die vitalen Bakterien eine komplette Tumorremission erzielt wurde.

Ein weiterer Befund der funktionellen *in vivo* Analysen war, dass auch die „präventive Vakzinierung“ mit *S. pyogenes* zu einer leichten Verzögerung des Tumorwachstums führt. Naive tumorfreie Tiere, die 28 Tage vor der Tumorinduktion zur Kontrolle eine einmalige Gabe von *S. pyogenes* M49wt erhielten, zeigten gegenüber tumortragenden Kontrolltieren ein leicht verlangsames Panc02-Tumorwachstum. Die lokale Injektion mit *S. pyogenes* führte damit bereits zur Immunstimulierung, welche primär der Kontrolle der bakteriellen Infektion diente (133, 184). Nach Applikation von Panc02-Tumorzellen konnten dann bereits aktivierte Neutrophile, Makrophagen und Granulozyten schnell rekrutiert werden, die direkten Einfluss auf das Wachstum der Tumoren nahmen. Vermutlich wurde aber aufgrund eines Defizits an proinflammatorischen Stimuli, sowie simultaner Sekretion von anti-inflammatorischem IL-10 aus Panc02 Zellen (201) keine dauerhafte Tumorregredienz erzielt, so dass es durch Überwindung der Immunabwehr, sowie Induktion einer tumorspezifischen Toleranz zur Manifestation des Tumorwachstums kam (40). Dennoch stellt die präventive Vakzinierung vor der Immuntherapie, wie in der Literatur mehrfach beschrieben, eine Option dar (180, 203, 204), um mit bakteriellen Komponenten sowohl direkt lokal, als auch indirekt systemisch die durch den Tumor induzierte Toleranz noch effektiver zu durchbrechen und eine dauerhafte tumorantigen-spezifische Immunität zu induzieren.

Die beschriebenen Effekte bezüglich des antitumoralen und immunstimulierenden Potentials von *S. pyogenes* belegen, dass es infolge der Therapie zu einer spezifischen Th₁-gerichteten Panc02-Antitumorimmunität kommt. Obgleich sich die Ergebnisse nach bakterio-lytischer Therapie mit dem vitalen M49wt von den Befunden nach Lysatbehandlung unterschieden, zeigten sie dennoch, dass *S. pyogenes* prinzipiell für eine aktive Immuntherapie geeignet ist. Diese Befunde führten zur Entwicklung folgenden Modells:

Die intratumorale Injektion induziert eine direkte Schädigung der Panc02 Zellen und vermittelt eine lokale Inflammation, welche vom Immunsystem des Wirtes erkannt wird. Dieses reagiert auf die Entzündung mit einer massiven, systemischen Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , TNF- α) und führt dadurch zur Infiltration von Immunzellen (v.a. neutrophile Granulozyten) aus dem peripheren Blut in den Tumor. Dort kommt es neben der Eliminierung von infektiösen Komponenten (bakterielle DNA, Toxine, etc.), ebenfalls zur Aufnahme von Fragmenten bereits lysierter Tumorzellen bzw. zur Eliminierung infizierter Tumorzellen. Resultierend aus diesen zunächst noch nicht MHC-

restringierten tumorlytischen Effekten, transportieren aktivierte APC dann aufgenommene Tumorantigene in die sekundären lymphatischen Organe, wie Lymphknoten und Milz, wo sie diese in Form von prozessierten Peptiden präsentieren. Naive T-Zellen zirkulieren durch diese Organe und werden durch die Bindung von L-Selektin (CD62L) am Endothel festgehalten. Binden sowohl ihr TZR als auch der Korezeptor an das entsprechende MHC-Molekül, wird ein erstes Signal in die Zelle weitergegeben. Dadurch wird die Signalkaskade ausgelöst, die zur Differenzierung in eine Effektorzelle führt. Über die kostimulatorischen Moleküle B7.1 und B7.2 auf APC werden dann T-Zellen, insbesondere CD8⁺-T-Lymphozyten, aktiviert und zur klonalen Expansion angeregt. Daraufhin kommt es neben der Expression antiapoptotischer Proteine, auch zur Produktion von Th₁- (TNF- α , IFN- γ) und Th₂- (IL-5, IL-6) Zytokinen, sowie zur weiteren Differenzierung und Proliferation der T-Zellen. Als Folge dieser Aktivierungsprozesse können dann Tumorantigen-spezifische Effektorzellen gebildet werden, welche primär durch zelluläre, aber auch durch humorale Mechanismen antitumorale Immunantworten vermitteln, die zur Lyse von Tumorzellen führen. Über die Entwicklung einer Gedächtnisantwort kommt es schließlich zur Immunprotektion, die den Wirt dauerhaft gegen Tumoren schützt.

5.3.6. Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen dem murinen und dem humanen System in Bezug auf die Infektion mit *S. pyogenes*

Ausgehend von den beschriebenen Ergebnissen zur antitumoralen Aktivität kann man schlussfolgern, dass wichtige Parallelen zwischen der humanen und der murinen Infektion mit *S. pyogenes* bestehen, die prinzipiell zu einer erfolgreichen Antitumorthherapie beitragen können. Zu diesen zählen: (I) die schnelle Zellyse nach der Infektion, die begleitet wird von Ulzeration und Nekrotisierung des Gewebes; (II) die signifikante und persistierende Erhöhung proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α und IFN- γ ; (III) die begleitende Aktivierung von Immunzellen, speziell NK-Zellen und DC; (IV) die massive Gewebeeinfiltration mit proinflammatorischen Zellen des nicht-adaptiven (Granulozyten), aber auch adaptiven Immunsystems (T-Zellen); sowie (V) die Fähigkeit zur Vermittlung einer protektiven Immunität.

Natürlich muss die Induktion einer spezifischen Immunreaktion gegen Tumorzellen durch *S. pyogenes* noch in weiteren Modellsystemen nachgewiesen werden. Verschiedene Gesichtspunkte müssen zusätzlich berücksichtigt werden, wenn man die Therapiestrategie vom murinen Modell auf den menschlichen Organismus und damit in die Klinik übertragen will. Der wichtigste Aspekt ist dabei in der Fähigkeit der Kontrolle einer Infektion mit vitalen *S. pyogenes* Bakterien zu suchen. Murine Makrophagen sind -wie eingangs bereits beschrieben- in der Lage, Streptokokken in der Abwesenheit opsonisierender Antikörper zu phagozytieren (172). Dies ist für humane Zellen nicht beschrieben. Die Bakterien besitzen Oberflächenproteine (M-Proteine) mit antiphagozytotischer Aktivität, die den Streptokokken zur Anheftung an die Epithelzellen dienen und auch systemisch das Wachstum in menschlichem

Blut ermöglichen. Durch verschiedene Interaktionen wird die Aktivierung des alternativen Komplementweges verlangsamt und die antikörperunabhängige Phagozytose des Erregers vermindert (205), was eine Kolonisierung von *S. pyogenes* erleichtert und einen negativen Einfluss auf die Bekämpfung der Infektion haben könnte. Dieses Risiko kann durch den Einsatz des Lysates umgangen werden. Allerdings kann bislang nicht beurteilt werden, ob es beim Menschen durch intratumorale Injektionen ebenfalls zu einer direkten Aktivierung des Immunsystems kommt, welche eine Tumorregression bewirken sollte. Jedoch konnte Coley vor mehreren Dekaden zeigen, dass sich bestimmte Tumoren (vornehmlich Sarkome) infolge lokaler Applikationen bakterieller Lysate aus *S. pyogenes*, vorübergehend zurückbildeten (97, 100). Ferner ist bekannt, dass nach repetetiver intratumoraler Applikation von antibiotisch (Penicillin) abgetöteten Streptokokken-Präparationen (= OK-432), antitumorale und immunstimulierende Effekte gegenüber unterschiedlichen Tumorentitäten vermittelt werden (206). Künftige Studien müssen jedoch zeigen, ob diese Therapieerfolge nicht nur in tierexperimentellen Systemen, sondern auch bei Patienten mit einem Pankreaskarzinom, insbesondere bei lokal weit fortgeschrittenem Tumorwachstum, bestätigt werden können.

5.3.7. Kritische Bewertung der aktiven Immuntherapie mit *S. pyogenes* und zukünftige Untersuchungen zur Anwendbarkeit dieser Therapiestrategie

Ziel dieser Arbeit war es, *S. pyogenes* im subkutanen Pankreaskarzinommodell der Maus einzusetzen und deren tumorlytisches, sowie immunstimulierendes Potential *in vivo* zu analysieren. Voraussetzung für den therapeutischen Einsatz der Bakterien war eine effiziente Abtötung der Tumorzellen, welche sowohl für humane, als auch murine Pankreaskarzinomzellen gezeigt wurde. Eine weitere wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Immuntherapie war die Stimulation des Immunsystems zu einer effektiven, gegen den jeweiligen Tumor gerichteten Immunantwort. In dieser Arbeit wurde im experimentellen Panc02-Tumormodell nachgewiesen, dass durch die lokale Applikation von *S. pyogenes* bzw. deren Lysaten, solide Tumoren ganz oder teilweise eliminiert werden können und dass diese Effekte auf der Induktion spezifischer Immunantworten basierten, die eine partielle Immunprotektion vermittelten. Diese Ergebnisse sind im Hinblick auf die Weiterentwicklung der bearbeiteten Therapiestrategie von Bedeutung. Um jedoch valide Aussagen bezüglich der Eignung der Behandlung in späteren klinischen Studien treffen zu können, müssen weiterführende Analysen erfolgen.

Bei den initialen *in vitro* Untersuchungen wurde bereits festgestellt, dass Pankreaskarzinomzellen zwar durch *S. pyogenes* getötet werden, jedoch Unterschiede in der Ausprägung der Zelltodinduktion in den infizierten Zellen bestehen (s. 5.3.1.). Es sollten daher zunächst Analysen zur Zytotoxizität von *S. pyogenes* auch gegenüber anderen Pankreaskarzinomzellen sowie weiteren Tumorentitäten durchgeführt werden, um das Spektrum der Anwendbarkeit dieser Therapiestrategie noch besser beurteilen zu können. Damit stellt sich auch die

Frage, ob Bakterien der Gattung *S. pyogenes* am besten für die Immuntherapie geeignet sind, oder ob eventuell andere Bakterienstämme bei potentiell geringerer Toxizität, vergleichbare Antitumor-Aktivität besitzen. In bereits durchgeführten experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass apathogene Bakterien der Gattung Bifidobakterium (*Bifidobacterium longum*), welche zur Normalflora des Magen-Darm-Traktes gehören, prinzipiell antitumoral wirksam sind (111, 113). Daten zur Beteiligung des Immunsystems bei der Tumorthherapie liegen allerdings nicht vor. Aus der Literatur ist bislang nur bekannt, dass Bifidobakterien eine Tumorlyse induzieren und damit zur Regression der Tumoren beitragen (111, 113). Andere Untersuchungen beschreiben dahingegen nur eine marginale Antitumor-Aktivität dieser, sowie anderer apathogener Bakterienstämme (Lactobacilli, Clostridia) (108). Die Einsetzbarkeit von apathogenen Bakterien im experimentellen Pankreaskarzinommodell ist daher auch im Hinblick auf die spezifische Aktivierung von Immunzellen fraglich.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die antitumoralen Effekte von *S. pyogenes* nicht nur auf die direkte Zytotoxizität, sondern auch auf die Induktion einer spezifischen Th₁-gerichteten Immunantwort zurückzuführen sind, bei der aktivierte NK-Zellen und CTL eine effektive Abwehr gegenüber Tumorzellen darstellen. Die in dieser Arbeit nach Einsatz des bakteriellen Lysates erhobenen Befunde belegten ferner dass durch avitale Strukturen von *S. pyogenes* ebenfalls antitumorale Effekte induziert werden können. Ausgehend von diesen Resultaten stellt sich die gewählte Bakterienspezies als geeignet für die experimentelle Immuntherapie beim Pankreaskarzinom dar. Vor diesem Hintergrund ist auch von Interesse, welche mikrobiellen Komponenten *in vivo* die Tumorlyse, sowie die beobachtete Stimulierung des zunächst unspezifisch, angeborenen (Granulozyten, Makrophagen) und sekundär adaptiven Immunsystems (T-Zellen) vermitteln, die dann zu einer effektiven Immunabwehr führen. Möglicherweise könnten auch durch einzelne mikrobielle Bestandteile (bakterielle DNA, Toxine, etc.) effektive Immunantworten ausgelöst werden, wie dies in Studien beschrieben ist (117, 187). Für diese weiterführenden Untersuchungen wäre dann der Einsatz der Immuntherapie in humanisierten Tiermodellen (= Xenomodelle) denkbar, welche die klinische Situation humaner Tumorerkrankungen gut reflektieren und dabei helfen können, die Mechanismen der Antitumorimmunität noch besser zu verstehen. Dadurch würde es dann auch möglich sein, die Aktivierbarkeit von humanen T-Zellen *in vitro* nach Therapie zu untersuchen und Aussagen zu den im humanen System wirksamen zell-vermittelten antitumoralen Effekten, treffen zu können.

Daraus resultiert schließlich die Frage, ob ein Therapieeffekt ebenfalls bei Tumoren zu erzielen ist, die orthotop im Pankreas induziert wurden, sowie unter den Bedingungen der Metastasierung, die das klinische Bild des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms darstellen. Dabei besteht schließlich die Möglichkeit, die Therapiestrategie in einem transgenen murinen Modell zu testen, bei dem Mäuse spontan Tumoren im Pankreas entwickeln, die ähnliche

bzw. identische genetische Aberrationen besitzen, wie die humanen Tumoren. Nach dem gegenwärtigen Therapieansatz der intratumoralen Applikation (s. 5.3.2.) könnten residuelle bzw. abgesiedelte Tumorzellen ausschließlich durch zirkulierende immunologische Effektorzellen eliminiert werden. Dafür ist es erforderlich eine starke und spezifische Aktivierung einer großen Anzahl von CTLs zu induzieren, die in der Lage sind, alle Tumorzellen abzutöten. Zur Durchführung einer Erfolg versprechenden Immuntherapie, d. h. einer Tumorremission oder Krankheitsstabilisierung, erscheint daher die Kombination mit einer systemischen Chemotherapie (Gemcitabin, 5-Fluorouracil) sinnvoll, wie sie experimentell und teilweise bereits klinisch bei anderen Tumorentitäten (Kolon- und Mammakarzinom) erfolgreich eingesetzt wird (74, 144).

Ungeachtet der noch zu bearbeitenden Fragestellungen weisen die vorgelegten Ergebnisse auf eine innovative immuntherapeutische Strategie hin, die bis zu klinischen Studien weiter optimiert werden soll.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Sowohl in klinischen als auch in experimentellen Therapiekonzepten wird versucht, die noch immer infauste Prognose für Patienten mit einem Pankreaskarzinom zu verbessern. Dabei finden neben konventionellen Ansätzen zunehmend auch immuntherapeutische Strategien Verwendung. Diese verfolgen das Ziel eine tumorantigen-spezifische Immunantwort zu induzieren und dadurch eine protektive Immunität gegenüber residuellen Tumorzellen sowie Metastasen zu vermitteln. Viele Tumoren sind aufgrund der verringerten Expression antigener Substanzen auf der Zelloberfläche, sowie der Sekretion immunsupprimierender Zytokine (IL-10, TGF- β) nicht oder nur gering immunogen und werden vom Immunsystem nicht als „Gefahr“ wahrgenommen. Dadurch entwickelt sich eine Toleranz mit gestörter Immunabwehr gegenüber dem Tumor. Die Immuntherapie setzt an diesem Punkt an und versucht, mit multimodalen Konzepten die Tumortoleranz zu brechen um damit eine erfolgreiche antitumorale Immunabwehr zu ermöglichen.

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Hypothese, dass durch gezielte mikrobielle Infektionen effektive zelluläre Immunantworten vom Th₁-Typ induziert werden können. Als Modellorganismus wurden Bakterien der Gattung *S. pyogenes* bezüglich ihrer Einsetzbarkeit als aktives Immuntherapeutikum untersucht. Im ersten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Bakterien serotypabhängig einen signifikant negativen Einfluss auf das zelluläre Wachstum haben und sich daher prinzipiell für eine Antitumorthherapie eignen. Die Untersuchungen ergaben, dass der Wildtypstamm M49 die stärkste zytotoxische Aktivität gegenüber Pankreaskarzinomzellen humanen und murinen Ursprungs besitzt. Zur Verifizierung dieser Beobachtungen *in vivo* wurde *S. pyogenes* Serotyp M49wt im syngen Panc02-Pankreaskarzinommodell der Maus therapeutisch eingesetzt. Die einmalige i. t. Infektion mit *S. pyogenes* führte zur kompletten Regression der zu Beginn der bakteriolytischen Therapie palpablen Tumoren. Begleitende Untersuchungen, in denen die Virulenzgen-Mutante Streptolysin S⁻ (SLS⁻mu) eingesetzt wurde, erzielten nicht annähernd die therapeutische Wirksamkeit des M49wt und belegten damit, dass das Toxin SLS einen wesentlichen Beitrag zur Vermittlung der Tumorregression leistet. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde das Therapiekonzept durch den Einsatz eines bakteriellen Lysates *in vivo* weiterentwickelt. Diese Analysen ergaben, dass auch ein avitales, nicht infektiöses Lysat des *S. pyogenes* M49wt einen signifikanten Einfluss auf das Tumorwachstum hat. Die zweimalige Injektion des Lysates induzierte eine schnelle Stagnation des Tumorwachstums und führte in einigen Fällen sogar zur kompletten Remission (29 %) innerhalb des Beobachtungszeitraums von 28 Tagen.

Weiterführende Analysen ergaben dann, dass die *in vivo* beobachteten Therapieeffekte auch auf eine Aktivierung des Immunsystems zurückzuführen sind. Detaillierte histologische und immunhistochemische Analysen zeigten eine massive T-Zellinfiltration in das Tumorgewebe, wobei der Anteil CD8⁺ T-Zellen, insbesondere nach Lysatbehandlung, dominierte.

Durchflusszytometrisch wurde bei beiden Therapieschemata ein massiver, transients Anstieg an Granulozyten, Monozyten und NK-Zellen (CD11b⁺, Gr1⁺, NK1.1⁺) im peripheren Blut und in der Milz detektiert, der mit einer systemischen Produktion der Th₁-Zytokine G-CSF, IFN- γ , sowie TNF- α einherging. Parallel kam es zu einer deutlichen Zunahme an aktivierten T- und B-Zellen sowie DC (CD40⁺, CD80⁺, CD86⁺), welche erste Hinweise auf eine Generierung spezifischer antitumoraler Immunantworten gaben. Diese konnten in weiterführenden funktionellen Untersuchungen zur *in vitro* Reaktivierbarkeit von Splenozyten, sowie in Analysen zur lytischen Aktivität von Lymphknoten-Lymphozyten gegenüber syngenem Tumorzellen bestätigt werden. Die aktive bakterielle Immuntherapie mit dem M49wt vermittelte eine Kreuzreaktivität gegen verschiedene Tumorentitäten. IFN- γ -ELISpot Analysen ergaben, dass neben Panc02 auch andere syngene Tumorzellen, d. h. EL4 (Lymphom) und CMT-93 (Rektumkarzinom) zeitabhängig die antigeninduzierte Sekretion von IFN- γ aus Splenozyten triggerten, wohingegen nicht-maligne Kontrollzellen (MC3T3-E1 (Fibroblasten), PBMC) keine IFN- γ Freisetzung induzierten. Darüber hinaus konnte eine kontinuierliche Zunahme der lytischen Aktivität von Lymphknoten-Lymphozyten gegenüber den untersuchten malignen Zelllinien detektiert werden. Vergleichbare Resultate wurden auch bei der Lysatbehandlung erhalten, wobei die Reaktivität dort fast ausschließlich gegen Panc02 Zellen gerichtet war. Bis zum Tag 21 nach der Lysattherapie kam es zu einer erhöhten IFN- γ Sekretion von Splenozyten durch Exposition mit Panc02 Zellen, welche mit einem graduellen Anstieg der Zytotoxizität der Lymphknoten-Lymphozyten (insbesondere NK-Zellen) verbunden war. Die Zielzelllyse war -in Analogie zu den Resultaten nach bakteriolytischer M49wt-Therapie- primär auf die Induktion von Apoptose zurückzuführen. Systemisch wurden über den gesamten Zeitraum erhöhte IFN- γ Konzentrationen im Plasma Lysat-behandelter Tiere nachgewiesen, die mit einem systemischen Anstieg an NK-Zellen und einer transienten Erhöhung zirkulierender CD8⁺-Lymphozyten verbunden waren. Diese Befunde hinsichtlich einer tumorspezifischen Aktivierung des Immunsystems konnten *in vivo* teilweise bestätigt werden. Tiere, bei denen es initial zu einer Therapie-bedingten Regression des Panc02-Tumors kam, wiesen eine deutliche Tumorstillstandverzögerung nach wiederholter Tumorzellapplikation auf (ca. 75 % im Vergleich zu Kontrollgruppen). Die Untersuchungen belegten damit, dass eine partielle protektive Immunität *in vivo* sowohl durch die Behandlung mit bakteriellem Lysat als auch mit dem M49wt erreicht werden kann.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass sich durch *S. pyogenes* bzw. dessen mikrobielle Komponenten in einem tierexperimentellen Modell eine spezifische antitumorale Immunantwort induzieren ließ. Dadurch wurde die Basis für die Weiterentwicklung dieser aktiven antitumoralen Immuntherapie geschaffen. Zur weiteren Optimierung des Therapieansatzes müssen zukünftige Untersuchungen an anderen Modellsystemen und letztlich klinische Studien folgen.

VII LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Laheru D, Jaffee EM. Immunotherapy for pancreatic cancer - science driving clinical progress. *Nat Rev Cancer*. **2005**; 5:459-67.
- (2) Adler G, Seufferlein T, Bischoff SC, Brambs HJ, Feuerbach S, Grabenbauer G, Hahn S, Heinemann V, Hohenberger W, Langrehr JM, Lutz MP, Mücke O, Neuhaus H, Neuhaus P, Oettle H, Schlag PM, Schmid R, Schmiegeler W, Schlottmann K, Werner J, Wiedenmann B, Kopp I. [Carcinoma of the pancreas: summary of guidelines 2007, issued jointly by 15 German specialist medical societies]. *Dtsch Med Wochenschr*. **2007**; 132:1696-700.
- (3) Lowenfels AB, Maisonneuve P. Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. **2006**; 20:197-209.
- (4) Schneider G, Lersch C, Schmid RM. Karzinogenese des Pankreaskarzinoms. *Chirurg* **2003**; 74: 165-170.
- (5) MacKenzie M.J., Molecular therapy in pancreatic adenocarcinoma. *Lancet Oncol*. **2004**; 5: 541-9.
- (6) Yeh JJ, Der CJ. Targeting signal transduction in pancreatic cancer treatment. *Expert opinion on therapeutic targets*. **2007**; 11:673-94.
- (7) Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res*. **2006**; 12:5423-34
- (8) Van Cutsem E, Aerts R, Haustermans K, Topal B, Van Steenberghe W, Verslype C. Systemic treatment of pancreatic cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. **2004**; 16:265-74.
- (9) Brentnall TA. Management strategies for patients with hereditary pancreatic cancer. *Curr Treat Options Oncol*. **2005**; 6:437-45.
- (10) Tafani A, Pregnotato A, Negri E, La Vecchia C. Alcohol consumption and risk of pancreatic cancer. *Nutr Cancer*. **1997**; 27:157-61.
- (11) Del Chiaro M, Boggi U, Presciuttini S, Bertacca L, Croce C, Mosca I, Mosca F. Genetics of pancreatic cancer: where are we now? Where are we going? *JOP*. **2005** 13; 6 (1 Suppl):60-7.
- (12) Baumgart M, Heinmöller E, Horstmann O, Becker H, Ghadimi BM. The genetic basis of sporadic pancreatic cancer. *Cell Oncol*. **2005**; 27:3-13.

- (13) Brand RE, Lynch HT. Genotype/phenotype of familial pancreatic cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am.* **2006**; 35:405-15.
- (14) Chowdhury P, Rayford PL. Smoking and pancreatic disorders. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* **2000**; 12:869-77.
- (15) Cho KR, Vogelstein B. Suppressor gene alterations in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *J Cell Biochem Suppl.* **1992**; 16G:137-41.
- (16) Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell.* **1996**; 87:159-70
- (17) Takaori K, Hruban RH, Maitra A, Tanigawa N. Pancreatic intraepithelial neoplasia. *Pancreas.* **2004**; 28:257-62.
- (18) Cohenuram M, Saif MW. Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition Strategies in Pancreatic Cancer: Past, Present and the Future. *JOP.* **2007**; 8:4-15.
- (19) Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE, Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res.* 1997, 57: 1731-1734 *Z Gastroenterol.* **2007**; 45:487-523.
- (20) Li D, Xie K, Wolff R, Abbruzzese JL. Pancreatic cancer. *Lancet.* **2004**; 363:1049-57.
- (21) Schneider G, Siveke JT, Eckel F, Schmid RM. Pancreatic cancer: basic and clinical aspects. *Gastroenterology.* **2005**; 128:1606-25.
- (22) Newman EA, Simeone DM, Mulholland MW. Adjuvant treatment strategies for pancreatic cancer. *J Gastrointest Surg.* **2006**; 10:916-26.
- (23) Ginzburg L, Payson BA. A variant of the Courvoisier syndrome in carcinoma of the gall bladder. *Ann Surg.* **1957**; 146:976-82.
- (24) Saur D, Schneider G, Schmid RM. Pankreaskarzinom-State of the Art. *Kompendium Gastroenterologie* **2006**; 1: 41-44.
- (25) Jones L, Russell C, Mosca F, Boggi U, Sutton R, Slavin J, Hartley M, Neoptolemos JP. Standard Kausch-Whipple pancreatoduodenectomy. *Dig Surg.* **1999**; 16:297-304.
- (26) Beger HG, Rau B, Gansauge F, Poch B, Link KH. Treatment of pancreatic cancer: challenge of the facts. *World J Surg.* **2003**; 27:1075-84.
- (27) Seufferlein T, von Wichert G, Adler G. Palliative Therapie des Pankreaskarzinoms. *Dtsch med Wochenschr.* **2007**; 132: 813-7.
- (28) Burris H, Storniolo AM. Assessing clinical benefit in the treatment of pancreas cancer: gemcitabine compared to 5-fluorouracil. *Eur J Cancer.* **1997**; 33 Suppl 1:S18-22.

- (29) Alberts SR, Gores GJ, Kim GP, Roberts LR, Kendrick ML, Rosen CB, Chari ST, Martenson JA. Treatment options for hepatobiliary and pancreatic cancer. *Mayo Clin Proc.* **2007**; 82:628-37.
- (30) Rocha-Lima CM, Soares HP, Raez LE, Singal R. EGFR targeting of solid tumors. *Cancer Control.* **2007**; 14:295-304.
- (31) Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, Au HJ, Murawa P, Walde D, Wolff RA, Campos D, Lim R, Ding K, Clark G, Voskoglou-Nomikos T, Ptasynski M, Parulekar W; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol.* **2007**; 25:1960-6.
- (32) Janeway C, Travers P. Immunologie 2. Auflage *Spektrum Akademischer Verlag* **1997**.
- (33) Yoon SJ, Heo DS, Kang JO, Lee SG, Kim CD, Sung MW, Kim NK: Synergistic anti-tumor effects with co-expression of GM-CSF and IFN-gamma in murine tumors. *Int J Cancer* **1998**; 77:907-12.
- (34) Banham AH, Powrie FM, Suri-Payer E. FOXP3⁺ regulatory T cells: Current controversies and future perspectives. *Eur J Immunol.* **2006**; 36:2832-6.
- (35) Linehan DC, Goedegebuure PS. CD25⁺ CD4⁺ regulatory T-cells in cancer. *Immunol Res.* **2005**; 32:155-168.
- (36) Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L, Flavell RA, Weissleder R, von Boehmer H, Khazaie K. Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2005**; 102:419-24.
- (37) Azuma T, Takahashi T, Kunisato A, Kitamura T, Hirai H. Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res.* **2003**; 63:4516-20.
- (38) Nakata M, Smyth MJ, Norihisa Y, Kawasaki A, Shinkai Y, Okumura K, Yagita H. Constitutive expression of pore-forming protein in peripheral blood $\gamma\delta$ T cells: implication for their cytotoxic role in vivo. *J Exp Med* **1990**; 172:1877-80.
- (39) Koizumi H, Liu CC, Zheng LM, Joag SV, Bayne NK, Holoshitz J, Young JD. Expression of perforin and serine esterases by human $\gamma\delta$ T cells. *J Exp Med.* **1991**; 173:499-502.
- (40) Ehrlich P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* **1909**; 5:273-90.

- (41) Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* **1970**; 13:1-27.
- (42) Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* **2002**; 3:991-8.
- (43) Ljunggren HG, Kärre K. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp Med.* **1985**; 162:1745-59.
- (44) Bennett M, Yu YY, Stoneman E, Rembecki RM, Mathew PA, Lindahl KF, Kumar V. Hybrid resistance: 'negative' and 'positive' signaling of murine natural killer cells. *Semin Immunol.* **1995**; 7:121-7.
- (45) Boon T, Kellermann O., Rejection by syngeneic mice of cell variants obtained by mutagenesis of a malignant teratocarcinoma cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1977**; 74:272-5.
- (46) Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol.* **1997**; 9:684-93.
- (47) Stremmel C, Klein P, Hohenberger W: Immuntoleranz und aktive Immunsuppression in der Onkologie. Immunologische Grundlagen und therapeutische Optionen. *Chirurg.* **2002**; 73:255-61.
- (48) Kessler JH, Melief CJ. Identification of T-cell epitopes for cancer immunotherapy. *Leukemia.* **2007**; 21:1859-74.
- (49) Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell.* **1988**; 53:549-54.
- (50) Tsang KY, Zaremba S, Nieroda CA, Zhu MZ, Hamilton JM, Schlom J. Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine. *J Natl Cancer Inst.* **1995**; 87:982-90.
- (51) Vierboom MP, Nijman HW, Offringa R, van der Voort EI, van Hall T, van den Broek L, Fleuren GJ, Kenemans P, Kast WM, Melief CJ. Tumor eradication by wild-type p53-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med.* **1997**; 186:695-704.
- (52) Lupberger J, Hildt E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis. *World J Gastroenterol.* **2007**; 13:74-81.
- (53) DiMaio D, Liao JB. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv Virus Res.* **2006**; 66:125-59.

- (54) Sotomayor EM, Borrello I, Levitsky HI. Tolerance and cancer: a critical issue in tumor immunology. *Crit Rev Oncog*. **1996**; 7:433-56.
- (55) Laheru D, Biedrzycki B, Jaffee EM. Immunologic approaches to the management of pancreatic cancer. *Cancer J*. **2001**; 7:324-37.
- (56) Ungefroren H, Voss M, Bernstorff WV, Schmid A, Kremer B, Kalthoff H. Immunological escape mechanisms in pancreatic carcinoma. *Ann N Y Acad Sci*. **1999**; 880:243-51
- (57) Schmielau J, Nalesnik MA, Finn OJ. Suppressed T-cell receptor zeta chain expression and cytokine production in pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res*. **2001**; 7:933s-939s.
- (58) Finke J, Ferrone S, Frey A, Mufson A, Ochoa A. Where have all the T cells gone? Mechanisms of immune evasion by tumors. *Immunol Today*. **1999**; 20:158-60.
- (59) O'Farrell AM, Liu Y, Moore KW, Mui AL. IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. *EMBO J*. **1998**; 17:1006-18.
- (60) Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*. **1995**; 155:1151-64.
- (61) Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol*. **2002**; 169:2756-61.
- (62) Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. **2003**; 299:1057-61.
- (63) Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. **2003**; 4:330-6.
- (64) Hinz S, Pagerols-Raluy L, Oberg HH, Ammerpohl O, Grüssel S, Sipos B, Grützmann R, Pilarsky C, Ungefroren H, Saeger HD, Klöppel G, Kabelitz D, Kalthoff H. Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer Res*. **2007**; 67:8344-50.
- (65) Algarra I, Collado A, Garrido F. Altered MHC class I antigens in tumors. *Int J Clin Lab Res*. **1997**; 27:95-102.

- (66) Bubenik J. MHC class I down regulation, tumour escape from immune surveillance and design of therapeutic strategies. *Folia Biol (Praha)*. **2005**; 51:1-2.
- (67) Sharkey RM, Goldenberg DM. Targeted therapy of cancer: new prospects for antibodies and immunoconjugates. *CA Cancer J Clin*. **2006**; 56:226-43.
- (68) Zafir-Lavie I, Michaeli Y, Reiter Y. Novel antibodies as anticancer agents. *Oncogene*. **2007**; 26:3714-33.
- (69) Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. **1975**; 256:495-7.
- (70) Mellstedt H. Monoclonal antibodies in human cancer. *Drugs Today (Barc)*. **2003**; 39 Suppl C:1-16.
- (71) Schuster M, Nechansky A, Kircheis R. Cancer immunotherapy. *Biotechnol J*. **2006**; 1:138-47.
- (72) Lode HN. Tumorimmunologie. Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Springer Berlin Heidelberg, **2005**; 471-484.
- (73) Reang P, Gupta M, Kohli K. Biological response modifiers in cancer. *Med Gen Med*. **2006**; 8:33.
- (74) Huber CH, Wölfel T. Immunotherapy of cancer: from vision to standard clinical practice. *J Cancer Res Clin Oncol*. **2004**; 130:367-74.
- (75) Kindler HL, Friberg G, Singh DA, Locker G, Nattam S, Kozloff M, Taber DA, Karrison T, Dachman A, Stadler WM, Vokes EE. Phase II trial of bevacizumab plus gemcitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *J Clin Oncol*. **2005**; 23:8033-40.
- (76) Saif MW. Anti-angiogenesis therapy in pancreatic carcinoma. *JOP*. **2006**; 7:163-73.
- (77) Fanger, M.W., Shen, L., Graziano, R.F. and Guyre, P.M. Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG. *Immunol Today*. **1989**; 10:92-9.
- (78) Milstein C, Cuello AC. Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature*. **1983**; 305:537-40.
- (79) Kostelny SA, Cole MS, Tso JY. Formation of a bispecific antibody by the use of leucine zippers. *J Immunol*. **1992**; 148:1547-53.
- (80) Fischer N, Léger O. Bispecific antibodies: molecules that enable novel therapeutic strategies. *Pathobiology*. **2007**; 74:3-14.

- (81) Somasundaram C, Arch R, Matzku S, Zöller M. Development of a bispecific F(ab')₂ conjugate against the complement receptor CR3 of macrophages and a variant CD44 antigen of rat pancreatic adenocarcinoma for redirecting macrophage-mediated tumor cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother.* **1996**; 42:343-50.
- (82) Hombach A, Tillmann T, Jensen M, Heuser C, Sircar R, Diehl V, Kruis W, Pohl C. Specific activation of resting T cells against tumour cells by bispecific antibodies and CD28-mediated costimulation is accompanied by Th1 differentiation and recruitment of MHC-independent cytotoxicity. *Clin Exp Immunol.* **1997**; 108:352-7.
- (83) Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, Rosenberg SA. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med.* **1982**; 155:1823-41.
- (84) Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy of cancer using lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin-2. *Important Adv Oncol.* **1986**; 55-91.
- (85) Fagan EA, Eddleston AL. Immunotherapy for cancer: the use of lymphokine activated killer (LAK) cells. *Gut.* **1987**; 28:113-6.
- (86) Mule JJ, Schwarz SL, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK-cells and recombinant IL 2. *Science.* **1984**; 225:1487-9.
- (87) Ridolfi R, Flamini E, Riccobon A, De Paola F, Maltoni R, Gardini A, Ridolfi L, Medri L, Poletti G, Amadori D. Adjuvant adoptive immunotherapy with tumour-infiltrating lymphocytes and modulated doses of interleukin-2 in 22 patients with melanoma, colorectal and renal cancer, after radical metastasectomy, and in 12 advanced patients. *Cancer Immunol Immunother.* **1998**; 46:185-93.
- (88) Zitvogel L, Mayordomo JL, Tjandrawan T, DeLeo AB, Clarke MR, Lotze MT, Storkus WJ. Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J Exp Med.* **1996**; 183:87-97.
- (89) Pecher G, Haring A, Kaiser L, Thiel E. Mucin gene (MUC1) transfected dendritic cells as vaccine: results of a phase I/II clinical trial. *Cancer Immunol Immunother.* **2002**; 51: 669-73.
- (90) Miyazaki J, Tsuzuki Y, Matsuzaki K, Hokari R, Okada Y, Kawaguchi A, Nagao S, Itoh K, Miura S. Combination therapy with tumor-lysate pulsed dendritic cells and antiangiogenic drug TNP-470 for mouse pancreatic cancer. *Int J Cancer.* **2005**; 117:499-505.

- (91) Lindenmann J, Klein PA. Viral oncolysis: increased immunogenicity of host cell antigen associated with influenza virus. *J Exp Med.* **1967**; 126:93-108
- (92) Ragnhammar P. Anti-tumoral effect of GM-CSF with or without cytokines and monoclonal antibodies in solid tumors. *Med Oncol.* **1996**;13:167-76.
- (93) Copier J, Dalgleish A. Overview of tumor cell-based vaccines. *Int Rev Immunol.* **2006**; 25:297-319.
- (94) Garnett CT, Greiner JW, Tsang KY, Kudo-Saito C, Grosenbach DW, Chakraborty M, Gulley JL, Arlen PM, Schlom J, Hodge JW. TRICOM vector based cancer vaccines. *Curr Pharm Des.* **2006**; 12:351-61.
- (95) Gjertsen MK, Gaudernack G. Mutated Ras peptides as vaccines in immunotherapy of cancer. *Vox Sang.* **1998**; 74 Suppl 2:489-95.
- (96) Renard V, Sonderbye L, Ebbenhøj K, Rasmussen PB, Gregorius K, Gottschalk T, Mouritsen S, Gautam A, Leach DR. HER-2 DNA and protein vaccines containing potent Th cell epitopes induce distinct protective and therapeutic antitumor responses in HER-2 transgenic mice. *J Immunol.* **2003**; 171:1588-95.
- (97) Nauts HC, McLaren JR. Coley toxins--the first century. *Adv Exp Med Biol.* **1990**; 267:483-500.
- (98) Nauts HC, Swift WE, Coley BL. The treatment of malignant tumors by bacterial toxins as developed by the late William B Coley, MD, reviewed in the light of modern research. *Cancer Res.* **1946**; 6:205-16.
- (99) Wiemann B, Starnes CO. Coley`s toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmac Ther.* **1994**; 64:529-64.
- (100) Hoption Cann SA, van Netten JP, van Netten C. Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgrad Med J.* **2003**; 79:672-80.
- (101) Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, Matory YL, Skibber JM, Shiloni E, Vetto JT, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med.* **1985**; 313:1485-92.
- (102) Mazzolini G, Narvaiza I, Martinez-Cruz LA, Arina A, Barajas M, Galofré JC, Qian C, Mato JM, Prieto J, Melero I. Pancreatic cancer escape variants that evade immunogene therapy through loss of sensitivity to IFN γ -induced apoptosis. *Gene Ther.* **2003**; 10:1067-78.
- (103) Li CY, Huang Q, Kung HF. Cytokine and immunogene therapy for solid tumors. *Cell Mol Immunol.* **2005**; 2:81-91.

- (104) Del Vecchio M, Bajetta E, Canova S, Lotze MT, Wesa A, Parmiani G, Anichini A. Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res.* **2007**; 13:4677-85.
- (105) Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* **2004**; 4:11-22.
- (106) Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* **1995**; 13:251-76.
- (107) Yoshizawa H, Kagamu H, Gejyo F. Cancer immunogene therapy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* **2001**; 49:337-43.
- (108) Dang LH, Bettegowda C, Huso DL, Kinzler KW, Vogelstein B. Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2001**; 98:15155-60.
- (109) Bettegowda C, Dang LH, Abrams R, Huso DL, Dillehay L, Cheong I, Agrawal N, Borzillary S, McCaffery JM, Watson EL, Lin KS, Bunz F, Baidoo K, Pomper MG, Kinzler KW, Vogelstein B, Zhou S. Overcoming the hypoxic barrier to radiation therapy with anaerobic bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2003**; 100:15083-8.
- (110) Agrawal N, Bettegowda C, Cheong I, Geschwind JF, Drake CG, Hipkiss EL, Tatsumi M, Dang LH, Diaz LA Jr, Pomper M, Abusedera M, Wahl RL, Kinzler KW, Zhou S, Huso DL, Vogelstein B. Bacteriolytic therapy can generate a potent immune response against experimental tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2004**; 101:15172-7.
- (111) Yazawa K, Fujimori M, Amano J, Kano Y, Taniguchi S. Bifidobacterium longum as a delivery system for cancer gene therapy: selective localization and growth in hypoxic tumors. *Cancer Gene Ther.* **2000**; 7:269-74.
- (112) Low KB, Ittensohn M, Le T, Platt J, Sodi S, Amoss M, Ash O, Carmichael E, Chakraborty A, Fischer J, Lin SL, Luo X, Miller SI, Zheng L, King I, Pawelek JM, Bermudes D. Lipid A mutant Salmonella with suppressed virulence and TNFalpha induction retain tumor-targeting in vivo. *Nat Biotechnol.* **1999**; 17:37-41.
- (113) Yazawa K, Fujimori M, Nakamura T, Sasaki T, Amano J, Kano Y, Taniguchi S. Bifidobacterium longum as a delivery system for gene therapy of chemically induced rat mammary tumors. *Breast Cancer Res Treat.* **2001**; 66:165-70.
- (114) Chabalgoity JA, Dougan G, Mastroeni P, Aspinall RJ. Live bacteria as the basis for immunotherapies against cancer. *Expert Rev Vaccines.* **2002**; 1:495-505.

- (115) Soto LJ 3rd, Sorenson BS, Kim AS, Feltis BA, Leonard AS, Saltzman DA. Attenuated *Salmonella typhimurium* prevents the establishment of unresectable hepatic metastases and improves survival in a murine model. *J Pediatr Surg.* **2003**; 38:1075-9.
- (116) Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka T, Sudo T, et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst* **1984**; 72:955-62.
- (117) Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, Kuramoto E, Yano O, Kataoka T, Tokunaga T. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol Immunol.* **1992**; 36:983-97.
- (118) Brandau S, Suttman H. Thirty years of BCG immunotherapy for non-muscle invasive bladder cancer: a success story with room for improvement. *Biomed Pharmacother.* **2007**; 61:299-305.
- (119) Punj V, Saint-Dic D, Daghfal S, Kanwar JR. Microbial-based therapy of cancer: a new twist to age old practice. *Cancer Biol Ther.* **2004**; 3:708-14.
- (120) Ackermann D, Schnyder M, Bandelier D, Studer UE.[Treatment of superficial tumors of the bladder with bacillus Calmette-Guérin] *J Urol (Paris).* **1986**; 92:33-8.
- (121) Hof H, Dörries R. Medizinische Mikrobiologie 2. Auflage *Georg Thieme Verlag Stuttgart* **2002**.
- (122) Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev* **2000**; 13: 470-511.
- (123) Cunningham MW. Pathogenesis of group A streptococcal infections and their sequelae. *Adv Exp Med Biol.* **2008**; 609:29-42.
- (124) Kreikemeyer B, McIver KS, Podbielski, A. Virulence factor regulation and regulatory networks in *Streptococcus pyogenes* and their impact on pathogen-host interactions. *Trends Microbiol* **2003**; 11:224-32.
- (125) Kreikemeyer B, Klenk M, Podbielski A The intracellular status of *Streptococcus pyogenes*: role of extracellular matrix binding proteins and their regulation. *Int J Med Microbiol.* **2004**; 294:177-88
- (126) Nelson D, Schuch R, Chahales P, Zhu S, Fischetti VA. PlyC: a multimeric bacteriophage lysin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2006**; 103:10765-70.
- (127) Corbett TH, Roberts BJ, Leopold WR, Peckham JC, Wilkoff LJ, Griswold DP Jr, Schabel FM Jr. Induction and chemotherapeutic response of two transplantable duc-

- tal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice. *Cancer Res.* **1984**; 44:717-26.
- (128) Wang B, Shi Q, Abbruzzese J, Xiong Q, Le X, Xie K. A novel, clinically relevant animal model of metastatic pancreatic adenocarcinoma biology and therapy. *Int J Gastrointest Cancer* **2001**; 29:37-46.
- (129) Schmidt T, Ziske C, Märten A, Endres S, Tiemann K, Schmitz V, Gorschlüter M, Schneider C, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG. Intratumoral immunization with tumor RNA-pulsed dendritic cells confers antitumor immunity in a C57BL/6 pancreatic murine tumor model. *Cancer Res.* **2003**; 63:8962-7.
- (130) Bauer C, Bauernfeind F, Sterzik A, Orban M, Schnurr M, Lehr HA, Endres S, Eigler A, Dauer M. Dendritic cell-based vaccination combined with gemcitabine increases survival in a murine pancreatic carcinoma model. *Gut.* **2007**; 56:1275-82.
- (131) Märten A, Ziske C, Schöttker B, Renoth S, Weineck S, Buttgereit P, Schakowski F, von Rücker A, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG. Interactions between dendritic cells and cytokine-induced killer cells lead to an activation of both populations. *J Immunother* (1997). **2001**; 24:502-10.
- (132) Greco R, De Martino L, Donnarumma G, Conte MP, Seganti L, Valenti P. Invasion of cultured human cells by *Streptococcus pyogenes*. *Res Microbiol.* **1995**; 146:551-60
- (133) Courtney HS, Hasty DL, Dale JB. Molecular mechanisms of adhesion, colonization, and invasion of group A streptococci. *Ann Med.* **2002**; 34:77-87.
- (134) Chen L, Calomeni E, Wen J, Ozato K, Shen R, Gao JX. Natural killer dendritic cells are an intermediate of developing dendritic cells. *J Leukoc Biol.* **2007**; 81:1422-33.
- (135) Ullrich E, Bonmort M, Mignot G, Chaput N, Taieb J, Menard C, Viaud S, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L. Therapy-induced tumor immunosurveillance involves IFN-producing killer dendritic cells. *Cancer Res.* **2007**; 67:851-3.
- (136) Hossfeld DK, Fiedler W, Gehling U, Mende T. Neoangiogenese und Tumorwachstum: Pathophysiologie und neue therapeutische Ansätze *Deutsches Ärzteblatt.* **2001**; 98: Seite A-1392 / B-1183 / C-1109.
- (137) Welsch T, Kleeff J, Friess H. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer: advances and challenges. *Curr Mol Med.* **2007**; 7:504-21.
- (138) Ryu B, Jones J, Hollingsworth MA, Hruban RH, Kern SE. Invasion-specific genes in malignancy: serial analysis of gene expression comparisons of primary and passaged cancers. *Cancer Res.* **2001**; 61:1833-8.

- (139) Seymour AB, Hruban RH, Redston M, Caldas C, Powell SM, Kinzler KW, Yeo CJ, Kern SE. Allelotype of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* **1994**; 54:2761-4.
- (140) Hartel M, Di Mola FF, Gardini A, Zimmermann A, Di Sebastiano P, Guweidhi A, Innocenti P, Giese T, Giese N, Büchler MW, Friess H. Desmoplastic reaction influences pancreatic cancer growth behavior. *World J Surg.* **2004**; 28:818-25.
- (141) Miyamoto H, Murakami T, Tsuchida K, Sugino H, Miyake H, Tashiro S. Tumor-stroma interaction of human pancreatic cancer: acquired resistance to anticancer drugs and proliferation regulation is dependent on extracellular matrix proteins. *Pancreas.* **2004**; 28:38-44.
- (142) Algarra I, Cabrera T, Garrido F. The HLA crossroad in tumor immunology. *Hum Immunol.* **2000**; 61:65-73.
- (143) Leach SD. Mouse models of pancreatic cancer: the fur is finally flying! *Cancer Cell.* **2004**; 5:7-11.
- (144) Von Hoff DD. What's new in pancreatic cancer treatment pipeline? *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* **2006**; 20:315-26.
- (145) Hochster HS, Haller DG, de Gramont A, Berlin JD, Philip PA, Moore MJ, Ajani JA. Consensus report of the international society of gastrointestinal oncology on therapeutic progress in advanced pancreatic cancer. *Cancer.* **2006**; 107:676-85.
- (146) Kawakami Y, Okada T, Akada M. Development of immunotherapy for pancreatic cancer. *Pancreas.* **2004**; 28:320-5.
- (147) Bendell J, Goldberg RM. Targeted agents in the treatment of pancreatic cancer: history and lessons learned. *Curr Opin Oncol.* **2007**; 19:390-5.
- (148) Liyanage UK, Goedegebuure PS, Moore TT, Viehl CT, Moo-Young TA, Larson JW, Frey DM, Ehlers JP, Eberlein TJ, Linehan DC. Increased prevalence of regulatory T cells (Treg) is induced by pancreas adenocarcinoma. *J Immunother* (1997). **2006**; 29:416-24.
- (149) Taketo Y, Taketo A. Cytolytic Effect of Streptolysin S Complex on Ehrlich Ascites Tumor Cells. *J Biochem* **1966**; 4:357-62.
- (150) Camarasa MV, Castro-Galache MD, Carrasco-García E, Garcia-Morales P, Saceda M, Ferragut JA. Differentiation and drug resistance relationships in leukemia cells. *J Cell Biochem.* **2005**; 94:98-108.
- (151) Hotz HG, Hines OJ, Foitzik T, Reber HA. Animal models of exocrine pancreatic cancer. *Int J Colorectal Dis.* **2000**; 15:136-43.

- (152) Liao DJ, Wang Y, Wu J, Adsay NV, Grignon D, Khanani F, Sarkar FH. Characterization of pancreatic lesions from MT-tgf alpha, Ela-myc and MT-tgf alpha/Ela-myc single and double transgenic mice. *J Carcinog.* **2006**; 5:19.
- (153) Feng J, Sun Q, Gao C, Dong J, Wei XL, Xing H, Li HD. Gene expression analysis of pancreatic cystic neoplasm in SV40Tag transgenic mice model. *World J Gastroenterol.* **2007**; 13:2218-22.
- (154) Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S, Tuveson DA. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell.* **2005**; 7:469-83.
- (155) An Z, Wang X, Kubota T, Moossa AR, Hoffman RM. A clinical nude mouse metastatic model for highly malignant human pancreatic cancer. *Anticancer Res.* **1996**; 16:627-31.
- (156) Mohammad RM, Dugan MC, Mohamed AN, Almatchy VP, Flake TM, Dergham ST, Shields AF, Al-Katib AA, Vaitkevicius VK, Sarkar FH. Establishment of a human pancreatic tumor xenograft model: potential application for preclinical evaluation of novel therapeutic agents. *Pancreas.* **1998**; 16:19-25.
- (157) Mohammad RM, Banerjee S, Li Y, Aboukameel A, Kucuk O, Sarkar FH. Cisplatin-induced antitumor activity is potentiated by the soy isoflavone genistein in BxPC-3 pancreatic tumor xenografts. *Cancer.* **2006**; 106:1260-8.
- (158) Schultz RM, Merriman RL, Toth JE, Zimmermann JE, Hertel LW, Andis SL, Dudley DE, Rutherford PG, Tanzer LR, Grindey GB. Evaluation of new anticancer agents against the MIA PaCa-2 and PANC-1 human pancreatic carcinoma xenografts. *Oncol Res.* **1993**; 5:223-8.
- (159) Sunamura M, Sun L, Lozonchi L, Duda DG, Kodama T, Matsumoto G, Shimamura H, Takeda K, Kobari M, Hamada H, Matsuno S. The antiangiogenesis effect of interleukin 12 during early growth of human pancreatic cancer in SCID mice. *Pancreas.* **2000**; 20:227-33.
- (160) Schneider C, Schmidt T, Ziske C, Tiemann K, Lee KM, Uhlinsky V, Behrens P, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG, Mühlradt PF, Schmidt J, Märten A. Tumour suppression induced by the macrophage activating lipopeptide MALP-2 in an ultrasound guided pancreatic carcinoma mouse model. *Gut.* **2004**; 53:355-61.
- (161) Mazzolini G, Prieto J, Melero I. Gene therapy of cancer with interleukin-12. *Curr Pharm Des.* 2003; 9:1981-91.

- (162) Seitz U, Wagner M, Vogg AT, Glatting G, Neumaier B, Greten FR, Schmid RM, Reske SN. In vivo evaluation of 5-[(18)F]fluoro-2'-deoxyuridine as tracer for positron emission tomography in a murine pancreatic cancer model. *Cancer Res.* **2001**; 61:3853-7.
- (163) Wack S, Hajri A, Heisel F, Sowinska M, Berger C, Whelan M, Marescaux J, Aprahamian M. Feasibility, sensitivity, and reliability of laser-induced fluorescence imaging of green fluorescent protein-expressing tumors in vivo. *Mol Ther.* **2003**; 7:765-73.
- (164) Capellá G, Farré L, Villanueva A, Reyes G, García C, Tarafa G, Lluís F. Orthotopic models of human pancreatic cancer. *Ann N Y Acad Sci.* **1999**; 880:103-9.
- (165) Betschel SD, Borgia SM, Barg NL, Low DE, De Azavedo JC. Reduced virulence of group A streptococcal Tn916 mutants that do not produce streptolysin S. *Infect Immun.* **1998**; 66:1671-79.
- (166) Yang WS, Park SO, Yoon AR, Yoo JY, Kim MK, Yun CO, Kim CW. Suicide cancer gene therapy using pore-forming toxin, streptolysin O. *Mol Cancer Ther.* **2006**; 5:1610-9.
- (167) Joh D, Wann ER, Kreikemeyer B, Speziale P, Höök M. Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. *Matrix Biol.* **1999**; 18:211-23.
- (168) Klenk M, Nakata M, Podbielski A, Skupin B, Schroten H, Kreikemeyer B. Streptococcus pyogenes serotype-dependent and independent changes in infected HEp-2 epithelial cells. *ISME J.* **2007**; 1:678-92.
- (169) Ichiyoshi Y, Endo K, Yamamoto M, Maehara Y, Sugimachi K.[Biological features determining the chemosensitivity of gastric cancer] *Hum Cell.* **1995**; 8:157-61. (Abstract, Artikel auf Japanisch)
- (170) Macris MH, Hartman N, Murray B, Klein RF, Roberts RB, Kaplan EL, Horn D, Zabriskie JB. Studies of the continuing susceptibility of group a streptococcal strains to penicillin during eight decades. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **1998**; 17:377-81.
- (171) Sierig G, Cywes C, Wessels MR, Ashbaugh CD. Cytotoxic effects of streptolysin o and streptolysin s enhance the virulence of poorly encapsulated group a streptococci. *Infect Immun.* **2003**; 71:446-55.
- (172) Goldmann O, Rohde M, Chhatwal GS, Medina E. Role of macrophages in host resistance to group A streptococci. *Infect Immun.* **2004**; 72:2956-63.

- (173) Nizet V, Beall B, Bast DJ, Datta V, Kilburn L, Low DE, De Azavedo JC. Genetic locus for streptolysin S production by group A streptococcus. *Infect Immun.* **2000**; 68:4245-54.
- (174) Datta V, Myskowski SM, Kwinn LA, Chiem DN, Varki N, Kansal RG, Kotb M, Nizet V. Mutational analysis of the group A streptococcal operon encoding streptolysin S and its virulence role in invasive infection. *Mol Microbiol.* **2005**; 56:681-95.
- (175) Nizet V. Streptococcal beta-hemolysins: genetics and role in disease pathogenesis. *Trends Microbiol.* **2002**; 10:575-80.
- (176) Ishii KJ, Kawakami K, Gursel I, Conover J, Joshi BH, Klinman DM, Puri RK. Antitumor therapy with bacterial DNA and toxin: complete regression of established tumor induced by liposomal CpG oligodeoxynucleotides plus interleukin-13 cytotoxin. *Clin Cancer Res.* **2003**; 9:6516-22.
- (177) Eisold S, Schmidt J, Ryschich E, Gock M, Klar E, von Knebel Doeberitz M, Linnebacher M. Induction of an antitumoral immune response by wild-type adeno-associated virus type 2 in an in vivo model of pancreatic carcinoma. *Pancreas.* **2007**; 35:63-72.
- (178) Kim HS, Choo YS, Koo T, Bang S, Oh TY, Wen J, Song SY. Enhancement of antitumor immunity of dendritic cells pulsed with heat-treated tumor lysate in murine pancreatic cancer. *Immunol Lett.* **2006**; 103:142-8.
- (179) Nagaraj S, Ziske C, Strehl J, Messmer D, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG. Dendritic cells pulsed with alpha-galactosylceramide induce anti-tumor immunity against pancreatic cancer in vivo. *Int Immunol.* **2006**; 18:1279-83.
- (180) Avogadri F, Martinoli C, Petrovska L, Chiodoni C, Transidico P, Bronte V, Longhi R, Colombo MP, Dougan G, Rescigno M. Cancer immunotherapy based on killing of Salmonella-infected tumor cells. *Cancer Res.* **2005**; 65:3920-7.
- (181) Ryan RM, Green J, Lewis CE. Use of bacteria in anti-cancer therapies. *Bioessays.* **2006**; 28:84-94.
- (182) Hartung T, von Aulock S, Wendel A. Role of granulocyte colony-stimulating factor in infection and inflammation. *Med Microbiol Immunol.* **1998**; 187:61-9.
- (183) Cervi D, Klement G, Stempak D, Baruchel S, Koki A, Ben-David Y. Targeting cyclooxygenase-2 reduces overt toxicity toward low-dose vinblastine and extends survival of juvenile mice with Friend disease. *Clin Cancer Res.* **2005**; 11(2 Pt 1):712-9.

- (184) Robert C, Kupper TS. Inflammatory skin diseases, T cells, and immune surveillance. *N Engl J Med.* **1999**; 341:1817-28.
- (185) Ni K, O'Neill HC. The role of dendritic cells in T cell activation. *Immunol Cell Biol.* **1997**; 75:223-30.
- (186) Miethke T, Wahl C, Holzmann B, Heeg K, Wagner H. Bacterial superantigens induce rapid and T cell receptor V beta-selective down-regulation of L-selectin (gp90Mel-14) in vivo. *J Immunol.* **1993**; 151:6777-82.
- (187) Wooldridge JE, Weiner GJ. CpG DNA and cancer immunotherapy: orchestrating the antitumor immune response. *Curr Opin Oncol.* **2003**; 15:440-5.
- (188) Tepel J, Dagvadorj O, Kapischke M, Sipos B, Leins A, Kremer B, Kalthoff H. Significant growth inhibition of orthotopic pancreatic ductal adenocarcinoma by CpG oligonucleotides in immunodeficient mice. *Int J Colorectal Dis.* **2006**; 21:365-72.
- (189) Smith TF, Johnston RB Jr. Functions of the spleen in host defense against infection. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* **1979**; 1:355-62.
- (190) Krieg AM, Hartmann G, Yi AK. Mechanism of action of CpG DNA. *Curr Top Microbiol Immunol.* **2000**; 247:1-21.
- (191) Schuurhuis DH, Fu N, Ossendorp F, Melief CJ. Ins and outs of dendritic cells. *Int Arch Allergy Immunol.* **2006**; 140:53-72.
- (192) Chong AS, Boussy IA, Jiang XL, Lamas M, Graf LH Jr. CD54/ICAM-1 is a costimulator of NK cell-mediated cytotoxicity. *Cell Immunol.* **1994**; 157:92-105.
- (193) Pillarisetty VG, Katz SC, Bleier JI, Shah AB, Dematteo RP. Natural killer dendritic cells have both antigen presenting and lytic function and in response to CpG produce IFN-gamma via autocrine IL-12. *J Immunol.* **2005**; 174:2612-8.
- (194) Viehl CT, Moore TT, Liyanage UK, Frey DM, Ehlers JP, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC. Depletion of CD4+CD25+ regulatory T cells promotes a tumor-specific immune response in pancreas cancer-bearing mice. *Ann Surg Oncol.* **2006**; 13:1252-8.
- (195) Pardoll DM, Topalian SL. The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity. *Curr Opin Immunol.* **1998**; 10:588-94.
- (196) Ossendorp F, Toes RE, Offringa R, van der Burg SH, Melief CJ. Importance of CD4 (+) T helper cell responses in tumor immunity. *Immunol Lett.* **2000**; 74:75-9.

- (197) Jäger E, Jäger D, Knuth A. CTL-defined cancer vaccines: perspectives for active immunotherapeutic interventions in minimal residual disease. *Cancer Metastasis Rev.* **1999**; 18:143-50.
- (198) Bantel H, Brünig T, Schulze-Osthoff K. Activation of caspases by death receptors. *Eur Cytokine Netw.* **1998**; 9:681-4.
- (199) Reber AJ, Turnquist HR, Thomas HJ, Lutz CT, Solheim JC. Expression of invariant chain can cause an allele-dependent increase in the surface expression of MHC class I molecules. *Immunogenetics.* **2002**; 54:74-81
- (200) Hellström I, Hellström KE, Zeidman L, Bernstein ID, Brown JP. Cell-mediated reactivity to antigens shared by Moloney-virus-induced lymphomas (LSTRA) and certain 3-methylcholanthrene-induced mouse sarcomas. *Int J Cancer* **1979**; 23:555-64.
- (201) Ballas ZK, Krieg AM, Warren T, Rasmussen W, Davis HL, Waldschmidt M, Weiner GJ. Divergent therapeutic and immunologic effects of oligodeoxynucleotides with distinct CpG motifs. *J Immunol.* **2001**; 167:4878-86.
- (202) Sivinski CL, Kohlgraf KG, VanLith ML, Morikane K, Tempero RM, Hollingsworth MA. Molecular requirements for CD8-mediated rejection of a MUC1-expressing pancreatic carcinoma: implications for tumor vaccines. *Cancer Immunol Immunother.* **2002**; 51:327-40.
- (203) Gabri MR, Mazorra Z, Ripoll GV, Mesa C, Fernandez LE, Gomez DE, Alonso DF. Complete antitumor protection by perioperative immunization with GM3/VSSP vaccine in a preclinical mouse melanoma model. *Clin Cancer Res.* **2006**; 12:7092-8.
- (204) Nakamura Y, Watchmaker P, Urban J, Sheridan B, Giermasz A, Nishimura F, Sasaki K, Cumberland R, Muthuswamy R, Mailliard RB, Larregina AT, Falo LD, Gooding W, Storkus WJ, Okada H, Hendricks RL, Kalinski P. Helper function of memory CD8⁺ T cells: heterologous CD8⁺ T cells support the induction of therapeutic cancer immunity. *Cancer Res.* **2007**; 67:10012-8.
- (205) Horstmann RD, Sievertsen HJ, Knobloch J, Fischetti VA. Antiphagocytic activity of streptococcal M protein: selective binding of complement control protein factor H. *Proc Natl Acad Sci USA* **1988**; 85:1657-61.
- (206) Homma S, Sagawa Y, Komita H, Koido S, Nagasaki E, Ryoma Y, et al. Mechanism of antitumor effect on mouse hepatocellular carcinoma by intratumoral injection of OK-432, a streptococcal preparation. *Cancer Immunol Immunother.* **2007**; 56:1265-74.

VIII LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name:	Maletzki, geb. Glawe
Vorname:	Claudia
Geburtsdatum:	21. Februar 1981
Geburtsort:	Rostock, Deutschland
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Familienstatus:	verheiratet

Schulbildung

1987 - 1992	Grundschule in Rostock
1992 - 1994	Gymnasium Nord in Rostock
1994 - 1999	Johann-Heinrich-von-Thünen-Gymnasium in Rostock
Juli 1999	Abitur

Universitätsausbildung

1999-2004	Studium der Biologie an der Universität Rostock
2001	Vordiplom an der Universität Rostock
2001-2003	tätig als studentische Hilfskraft in der Abteilung Genetik/Immunbiologie im Fachbereich Biowissenschaften/Immunbiologie
2003-2004	Diplomarbeit an der Universität Rostock Thema: „Charakterisierung der chronischen DBTC-Pankreatitis der Ratte: Eine intravitalfluoreszenzmikroskopische, histologische und immunhistochemische Analyse“
August 2004	Diplomprüfung und Erlangung des akademischen Grades Diplombiologin
Oktober 2004- Februar 2005	tätig als wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Gastroenterologie/Medizinische Fakultät
Seit März 2005	Doktorarbeit an der Universität Rostock Thema: „Evaluierung und Etablierung eines aktiven, immuntherapeutischen Ansatzes mit <i>S. pyogenes</i> im experimentellen Pankreaskarzinommodell der Maus“

IX PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

Publikationen

Glawe C, Emmrich J, Sparmann G, Vollmar B: In vivo characterization of developing chronic pancreatitis in rats. *Lab Invest* **2005**; 85: 193-204.

Eipel C, Schuett H, Glawe C, Bordel R, Menger MD, Vollmar B: Pifithrin-alpha induced p53 inhibition does not affect liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *J Hepatol* **2005**; 43: 829-35.

Schuett H, Eipel C, Maletzki C, Menger MD, Vollmar B: NO counterbalances HO-1 overexpression-induced acceleration of hepatocyte proliferation in mice. *Lab Invest* **2007**; 87: 602-12.

Maletzki C*, Linnebacher M*, Kreikemeyer B, Emmrich J: Pancreatic cancer regression by intratumoral injection of live *Streptococcus pyogenes* in a syngeneic mouse model. *Gut* **2008**; 57:483-91.

* Autoren haben in gleichem Maße zur Arbeit beigetragen

Linnebacher M*, Maletzki C*, Charrier F, Emmrich J, Kreikemeyer B: Lysates of *S. pyogenes* serotype M49 induce pancreatic tumor growth delay by specific and unspecific antitumor immune responses. *J Immunother.* **2008**;31:704-13.

* Autoren haben in gleichem Maße zur Arbeit beigetragen

Abstracts

Glawe C, Kreikemeyer B, Linnebacher M, Liebe S, Emmrich J: Tumorregression im heterotopen Pankreaskarzinommodell der Maus durch intratumorale Injektion von *Streptococcus pyogenes*. *Z Gastroenterol* **2006**; 44: P343.

Maletzki C, Linnebacher M, Emmrich J, Kreikemeyer B: The potential of intratumoral injection of *S. pyogenes* to achieve a bacterial related immune response against tumor cells followed by tumor regression. *Pancreas* **2006**; 33: 480.

Maletzki C, Charrier F, Kreikemeyer B, Linnebacher M, Liebe S, Emmrich J: Regression of pancreatic carcinoma in mice after intratumoral injection of attenuated *S. pyogenes* and a streptococcal lysate. *DDW* **2007**; M2025

Maletzki C, Linnebacher M, Kreikemeyer B, Charrier F, Emmrich J: Regression of pancreatic carcinoma by intratumoral injection of a streptococcal lysate in mice. *CIMT* **2007**; P05.

Maletzki C, Gock M, Schuschan S, Kreikemeyer B, Emmrich J, Linnebacher M. Active unspecific immunotherapy of experimental pancreatic carcinoma with bacteria. *CIMT* **2008**; in submission.

Maletzki C, Linnebacher M, Kreikemeyer B, Emmrich J: Pancreatic tumor growth delay in mice by intratumoral application of a streptococcal lysate. *EPC* **2008**; in submission.

Vorträge

Glawe C, Emmrich J, Sparmann G, Vollmar B: In vivo characterization of developing chronic pancreatitis in rats. 8. Chirurgische Forschungstage, Mannheim, 28.-30. Oktober, **2004**.

Glawe C, Emmrich J, Sparmann G, Vollmar B: *In vivo* Analyse der Zellintegrität und Mikrozirkulation bei chronischer DBTC-Pankreatitis der Ratte. 25. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclub (DPC), Berlin 18.-20. November, **2004**.

Glawe C: *In vitro* Analyse zur Wirkung von *Streptococcus pyogenes* auf Pankreaskarzinomzellen. 26. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclub (DPC), Freiburg 17.-19. November, **2005**.

Maletzki C, Charrier F, Linnebacher M, Kreikemeyer B, Liebe S, Emmrich J: Immuntherapie des Pankreaskarzinoms am Mausmodell mit *S. pyogenes*. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclub (DPC), Greifswald, 23.-25. November, **2006**.

Poster

Glawe C, Kreikemeyer B, Linnebacher M, Liebe S, Emmrich J: Tumorregression im heterotopen Pankreaskarzinommodell der Maus durch intratumorale Injektion von *Streptococcus pyogenes*. 61. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Hannover, 13.-16. September, **2006**.

Maletzki C, Linnebacher M, Emmrich J, Kreikemeyer B: The potential of intratumoral injection of *S. pyogenes* to achieve a bacterial related immune response against tumor cells followed by tumor regression. American pancreatic association (APA) & International association of pancreatology (IAP) Joint Meeting, Chicago, November 1-4, **2006**.

Maletzki C, Linnebacher M, Kreikemeyer B, Charrier F, Emmrich J: Regression of pancreatic carcinoma by intratumoral injection of a streptococcal lysate in mice. 5th Annual CIMT Meeting, Würzburg, 12-14. April, **2007**.

Maletzki C, Charrier F, Kreikemeyer B, Linnebacher M, Liebe S, Emmrich J: Regression of pancreatic carcinoma in mice after intratumoral injection of attenuated *S. pyogenes* and a streptococcal lysate. Digestive Disease Week (DDW), Washington, May, 19-24, **2007**.

Sturm D, Maletzki C, Sparmann G, Liebe S, Emmrich J: Der Effekt von Cis-Hydroxyprolin auf das Pankreaskarzinom der Maus. Jahrestagung des Deutschen Pankreasclub (DPC), Dresden, 22.-24. November, **2007**.

A EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und ohne fremde Hilfe verfasst habe, keine außer den von mir angegebenen Hilfsmitteln und Quellen dazu verwendet habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Claudia Maletzki

Rostock, April 2008

B DANKSAGUNG

Ich danke Herrn Prof. Emmrich für die Bereitstellung des interessanten Themas, sowie für die Betreuung und Beratung während der Dissertation.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Michael Linnebacher für die stetige Unterstützung und Begleitung meiner Doktorarbeit. Ich danke ihm für die Einführung in immunologische Arbeitstechniken, die regelmäßigen Diskussionen bezüglich des weiteren Vorgehens und die fachlich hervorragende Betreuung.

Ganz lieben Dank auch an Dr. Grit Waitz, die mir durch ihre bedingungslose Teilnahme an ihrem Erfahrungsschatz nicht nur bei fachlichen Problemen immer eine große Hilfe war. Die Zusammenarbeit mit Ihr hat mir immer großen Spaß gemacht. Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. Bernd Kreikemeyer ganz herzlich für die Unterstützung in allen mikrobiellen Fragestellungen bedanken, sowie die Möglichkeit, die mikrobiologischen Arbeitstechniken in seinem Labor erlernen und selbständig durchführen zu können. Ich danke Franziska Charrier für die tatkräftige Unterstützung als Doktorandin und ihre kontinuierlich hohe Motivation und Einsatzbereitschaft bei allen praktischen Untersuchungen.

Ich danke auch Frau Dr. Sparmann für die hilfreichen inhaltlichen Hinweise. Ein weiterer Dank gilt dem histologischen Labor des Instituts für Pathologie der Universität Rostock für die Anfertigung der Gewebeschnitte und Färbungen und auch Frau Katja Bergmann für die Durchführung von histologischen Arbeiten. Außerdem danke ich Frau Prof. Vollmar für die Bereitstellung der Räume für die tierexperimentellen Untersuchungen und Frau Kathrin Sievert-Küchenmeister für ihre Hilfe beim Erlernen der chirurgischen Untersuchungstechniken.

Frau Angela Schumacher danke ich für die großartige Unterstützung in allen administrativen Bereichen. Auch ein ganz großes Dankeschön an alle weiteren Laborkolleginnen und -kollegen für das angenehme Arbeitsklima, die Hilfe bei allen kleinen und größeren Problemen und die schöne Zeit im Labor.

Abschließend möchte ich mich natürlich ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, die mir das Studium und die Promotion erst ermöglicht haben und mir die ganze Zeit unterstützend zur Seite gestanden haben.

Und Gunnar, Dir danke ich dafür, dass Du immer für mich da bist...